



ROGER NERY FÃO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DE
MICROPARTÍCULAS DE DIIDROXIACETONA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

URUGUAIANA/RS

2018

ROGER NERY FÃO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DE
MICROPARTÍCULAS DE DIIDROXIACETONA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Farmácia da Universidade
Federal do Pampa, Campus Uruguaiana, como
requisito parcial para obtenção do título de
Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Cheila D. O. Stopiglia

Coorientadora: Profa. Dra. Leticia M. Colomé

URUGUAIANA/RS

2018

Roger Nery Fão

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA IN VITRO DE
MICROPARTÍCULAS DE DIIDROXIACETONA**

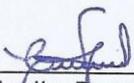
Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Farmácia da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), como requisito parcial para aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Cheila Denise Ottonelli Stopiglia

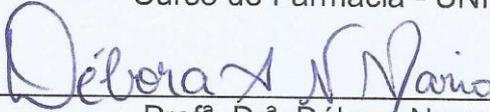
Área de concentração: Farmácia

Trabalho de conclusão de curso defendido e aprovado em: 02 / 07 / 2018

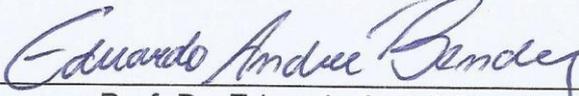
Banca examinadora:



Prof^a. Dr^a. Cheila Denise Ottonelli Stopiglia
Orientadora
Curso de Farmácia - UNIPAMPA



Prof^a. Dr^a. Débora Nunes Mario
Curso de Farmácia - UNIPAMPA



Prof. Dr. Eduardo André Bender
Curso de Farmácia - UNIPAMPA

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a toda a minha família,
por todo o incentivo e ajuda recebida.

AGRADECIMENTOS

A minha família, por todo o apoio e incentivo.

A minha querida avó Maria Valentina Sampaio, pois esta é a pessoa mais importante na minha vida, foi ela quem me educou e me ama incondicionalmente, dela recebo todos os gestos e palavras que sempre estão acompanhados de muito afeto e carinho, sempre estive ao meu lado nas horas que mais precisei, sempre me incentivando e me orientando a seguir o caminho correto, acreditando em tudo de olhos fechados, tendo sempre o seu colo como meu refugio seguro. Como não ser apaixonada por ela? Tenho certeza, se algum dia precisasse dela e estivesse do outro lado do mundo, imediatamente arranjará um jeito na distância, nem que fosse apenas para me dar um braço. Meu obrigado “mãe”, e sempre contes comigo para tudo, te amo!

A Andressa Viapiana Naimayer, que estive ao meu lado, sempre me incentivando e ajudando quando mais precisava.

A minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Cheila Stopiglia por toda dedicação, confiança e ajuda empregada durante a realização do trabalho de conclusão do curso e por ter muita paciência com este orientado, obrigada.

A minha coorientadora Prof^ª. Dr^ª Leticia Colomé, por toda a ajuda e dedicação depositada.

A todos os amigos que conquistei ao longo desses cinco anos, Alcides Parisotto, Carlos Eduardo da Rosa e Gabriel Viçozzi o meu muito obrigado por tudo!

“Não importa o quão ruim a vida possa ser, há sempre alguma coisa que você pode fazer e ter sucesso. Enquanto há vida, há esperança.”

(Stephen Hawking)

RESUMO

Atualmente, a terapêutica das onicomicoses está baseada em três formas de tratamentos: terapia tópica, terapia sistêmica e terapia tópica e sistêmica. Alguns fatores podem interferir na resposta terapêutica, como a adesão ao tratamento, possibilidade de interações medicamentosas e a fatores relacionados ao estado clínico do paciente, fatores epidemiológicos e avaliação laboratorial. Ainda, existem fatores relacionados aos microrganismos, como a emergência da resistência aos antifúngicos, a qual alerta para a necessidade do desenvolvimento de estratégias que possam evitar a sua propagação. Assim, o objetivo deste estudo foi produzir uma formulação microparticulada inovadora contendo diidroxiacetona (DHA) e avaliar seus efeitos *in vitro* frente à *Candida* spp. através da avaliação da CIM e CFM. A formulação de micropartículas de DHA (MpDHA) foi preparada pelo método de aspersão e, após o preparo, foi realizada a incorporação das mesmas em um gel. Posteriormente, foi verificada a sensibilidade *in vitro* de isolados fúngicos frente às MpDHA. A determinação do diâmetro da partícula mostra através da polidispersão (SPAN) que foi de 1,299 das MpDHA, onde alcançaram valores de referência para o método utilizado. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) obtida para a DHA livre e para a MpDHA apresentaram igualmente 1,56 mg/mL. Observando o resultado da Concentração Fungicida Mínima (CFM) pode-se perceber que a MpDHA apresentou efeito fungicida em concentrações inferiores ao fármaco livre. No entanto, o ensaio *in vitro* de sensibilidade antifúngica ao gel de micropartículas precisa de melhoramento na sua padronização, pois não foram obtidos resultados conclusivos. De acordo com os resultados desse estudo, conclui-se que as micropartículas contendo DHA obtiveram um tamanho ideal, com distribuição uniforme e formato regular, preservando a atividade antifúngica e potencializando o efeito fungicida contra os micro-organismos avaliados.

Palavras-chave: diidroxiacetona, onicomicoses, candidíase, microencapsulação.

ABSTRACT

Currently, the treatment of onychomycosis is based on three forms of treatments: topical therapy, systemic therapy and topical and systemic therapy. Some factors may interfere in the therapeutic response, such as adherence to treatment, possibility of drug interactions and factors related to the patient's clinical status, epidemiological factors and laboratory evaluation. Also, there are factors related to microorganisms, such as the emergence of antifungal resistance, which warns of the need to develop strategies that can prevent its spread. Thus, the objective of this study was to produce an innovative microparticulate formulation containing dihydroxyacetone (DHA) and to evaluate its effects in vitro against *Candida* spp. through the evaluation of the CIM and CFM. The DHA microparticle formulation (MpDHA) was prepared by the sprinkling method and, after the preparation, the incorporation of the same into a gel was carried out. Subsequently, the in vitro susceptibility of fungal isolates to MpDHA was verified. The determination of the particle diameter showed through the polydispersion (SPAN), which was 1,299 of MpDHA, where they reached reference values for the method used. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) obtained for free DHA and for MpDHA also showed 1.56 mg / mL. Observing the result of the Minimum Fungicide Concentration (CFM), it can be seen that MpDHA showed a fungicidal effect at concentrations lower than the free drug. However, the in vitro assay of antifungal sensitivity to microparticle gel needs to be improved in its standardization, since conclusive results have not been obtained. According to the results of this study, it was concluded that the DHA-containing microparticles obtained an ideal size, with uniform distribution and regular shape, preserving the antifungal activity and potentiating the fungicidal effect against the microorganisms evaluated.

Keywords: dihydroxyacetone, onychomycosis, candidiasis, microencapsulation.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição quali-quantitativa das micropartículas de diidroxiacetona preparadas pelo método de aspersão. **24**

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima do isolado de *Candida albicans* 28367 ATCC....**29**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC – *American Type Culture Collection*;

CIM – Concentração Inibitória Mínima;

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*;

DHA– Diidroxiacetona;

FDA - *Food and Drug Administration*;

FPS - Fator de Proteção Solar;

MOPS - ácido morfolinopropanosulfônico;

MP – micropartícula;

MpDHA - micropartículas de diidroxiacetona;

PDA - Potato Dextrose Ágar;

UFC - unidade formadora de colônias;

UVA – Radiação ultravioleta tipo A;

µm – micrômetro.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. JUSTIFICATIVA.....	13
3. OBJETIVO.....	14
3.1 Objetivo Geral.....	14
3.2 Objetivos Específicos.....	14
4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
4.1 Diidroxiacetona.....	15
4.2 Micropartículas poliméricas.....	17
4.3 Onicomicose.....	17
4.3.1 Anatomia e composição da unha.....	17
4.3.2 Etiologia da onicomicose.....	18
4.3.3 Onicomicoses causadas por dermatófitos.....	20
4.3.4 Onicomicose causada por <i>Candida</i> spp.....	21
4.3.5 Epidemiologia.....	21
4.3.6 Diagnóstico de onicomicoses.....	22
4.3.7 Tratamentos convencionais.....	22
5. METODOLOGIA.....	24
5.1 Preparação das micropartículas de Diidroxiacetona.....	24
5.2 Rendimento.....	24
5.3 Análise granulométrica.....	24
5.4 Preparo da base líquida espessada.....	25
5.5 Ensaio <i>in vitro</i> de suscetibilidade fúngica às micropartículas.....	25
5.6 Ensaio <i>in vitro</i> de suscetibilidade fúngica ao gel de micropartículas.....	25
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
6.1 Preparação das micropartículas de DHA.....	27
6.2 Rendimento.....	27
6.3 Determinação do tamanho das partículas.....	27
6.4 Concentração Inibitória Mínima.....	28
6.5 Ensaio <i>in vitro</i> de sensibilidade antifúngica ao gel de micropartículas.....	29
7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	30
8. REFERÊNCIAS.....	31

1.INTRODUÇÃO

Onicomicose é um termo amplo atribuído às infecções fúngicas que atingem as unhas, podem ser causadas por fungos dermatófitos, leveduras e fungos filamentosos não dermatófitos. Os dermatófitos são um grupo de fungos filamentosos taxonomicamente classificados nos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*, que se caracterizam pela capacidade de invadir tecidos queratinizados como pele, pelo e unhas, causando infecções superficiais (KIOSHIMA *et al.*, 2002). *Candida* spp. é uma levedura pertencente a microbiota, mas se classifica como um microrganismo oportunista, podendo ocasionar também infecções fúngicas como candidíase oral, candidíase vaginal, intertrigo, paroníquia e onicomicoses (ROSSI T. *et al.*, 2011).

O tratamento para as onicomicoses tem terapias bem distintas como: terapia tópica, terapia sistêmica e terapia combinada (tópica e sistêmica). Sendo assim, fatores que possam interferir na escolha do antifúngico alteram a resposta terapêutica (RAJAN & VASUDEVAN, 2012). No entanto, o aumento da resistência aos antifúngicos precisa de uma atenção especial (MENEZES, 2009). Dessa forma, novos ativos com possível ação antifúngica vêm sendo testados. Estudo realizado por Stopiglia e colaboradores (2011) mostrou que a diidroxiacetona apresenta atividade antifúngica *in vitro* frente a diversas cepas de *Candida* spp. e dermatófitos. Este ativo pode ter sua atividade potencializada utilizando-se a técnica de microencapsulação, que é uma alternativa para alterar as condições físico-químicas dos princípios ativos, aumentando sua eficácia e diminuindo seus efeitos adversos. As micropartículas são formadas por uma membrana que envolve pequenas partículas do ativo com o objetivo de proteger o material das condições adversas do meio, tais como luz, umidade, oxigênio e interações com outros compostos, estabilizando o produto, aumentando a vida útil e promovendo a liberação controlada do encapsulado em condições pré-estabelecidas (SANTOS, 2005).

2. JUSTIFICATIVA

As onicomicoses são infecções causadas por fungos que se alimentam da queratina, proteína que forma a maior parte das unhas. As unhas dos pés são as mais afetadas por enfrentarem ambientes úmidos, escuros e quentes com maior frequência do que as das mãos.

A terapia medicamentosa da onicomicose é geralmente, prolongada, pouco efetiva e de alto custo. Para o tratamento convencional são administrados antifúngicos em associação e por longos períodos. Além disso, o impedimento para permear as camadas das unhas é uma das grandes dificuldades para a ação destes fármacos. Isso impulsiona um aumento da resistência microbiana aos fármacos usuais, com altos índices de recidiva dessas micoses. Por isso, atualmente existe a necessidade de desenvolver novas alternativas tecnológicas e opções terapêuticas que possam aperfeiçoar a liberação dos fármacos e seu padrão posológico, além de ter a disponibilidade de agir em sítios específicos.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho foi produzir uma formulação microparticulada inovadora contendo diidroxiacetona e avaliar o efeito *in vitro* frente à fungos dermatófitos e *Candida* spp.

3.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver um carreador polimérico microparticulado para encapsulação de diidroxiacetona;
- Realizar estudos de pré-formulação a fim de definir a compatibilidade entre os componentes utilizados na preparação das micropartículas de diidroxiacetona e uma base comercial para sua veiculação;
- Produzir uma base líquida espessada com viscosidade adequada (gel) para utilização tópica em unhas capaz de veicular as micropartículas preparadas;
- Avaliar *in vitro* a sensibilidade de fungos dermatófitos e *Candida* spp. frente a formulação de diidroxiacetona produzida.

4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.1 Diidroxiacetona

A 1,3-dihidroxiopropan-2-ona, ou diidroxiacetona (DHA) é uma molécula simples de três carbonos aquiral e não tóxica, fisiologicamente formada no ciclo de Krebs (PETERSEN *et al.*, 2004). Atualmente é muito utilizada na indústria de cosméticos como princípio ativo dos bronzeadores artificiais (MISHRA; JAIN; KUMAR, 2008; HU & ZHENG, 2011), como intermediário em sínteses químicas (FENG *et al.*, 2012) e em produtos farmacêuticos, principalmente para o tratamento de doenças de pele (FESQ *et al.*, 2001).

Embora desde a década de 20 a DHA tenha sido observada como agente de coloração da pele, somente na década de 50 estudos possibilitaram reproduzir consistentemente este efeito. Nessa época, Eva Wittgenstein estudava o uso de DHA como fármaco por via oral no tratamento de crianças com deficiência no armazenamento de glicogênio (MISHRA *et al.*, 2008). Foi observado que essa substância conferia uma coloração acastanhada à pele, quando em contato com a mesma. Continuando a estudar esse efeito, Eva Wittgenstein verificou que este atingia apenas a camada superficial da pele. Tais pesquisas abriram caminho para os bronzeadores artificiais e em 1960, a DHA foi aprovada pelo órgão americano *Food and Drug Administration* (FDA) para uso em produtos cosméticos, como bronzeadores artificiais, na proporção de 5-15% (p/p) (SENEVIRATNE *et al.*, 2012).

A principal vantagem do uso da DHA nestes produtos é proporcionar um bronzeado sem a necessidade de exposição ao sol, ou seja, protegido dos efeitos malignos das radiações solares e sem o risco de desenvolvimento de câncer. O câncer de pele é o mais frequente no Brasil, com alto índice de metástase, correspondendo a 25% dos casos de tumores registrados. A estimativa é que em 2018 ocorram 165 mil novos casos (INCA, 2017). No bronzeamento artificial, a DHA reage com os aminoácidos presentes na camada superior da pele, o estrato córneo, para produzir um efeito de escurecimento, devido ao pigmento melanoidina que se assemelha a melanina. O mecanismo de ação é baseado na reação de Maillard, onde os carboidratos reagem com aminoácidos para produzir a pigmentação marrom (CIRIMINNA *et al.*, 2006). A intensidade da cor desenvolvida é diretamente proporcional à concentração de diidroxiacetona usada. Devido à penetração apenas até ao estrato córneo, não causa quaisquer efeitos nocivos sobre a pele (FUSARO; RICE, 2005). A cor marrom obtida na pele não absorve na extremidade inferior do espectro visível, conferindo proteção contra radiação ultravioleta do tipo A (UVA) e assim um efeito modesto sobre o fator de proteção solar (FPS), fornecendo proteção FPS 3 ou 4 (LEVY, 2001).

A DHA tem sido estudada como alternativa no tratamento do vitiligo, doença de despigmentação da pele com uma prevalência mundial de 0,5-4%, afetando principalmente os jovens (FESQ *et al.*, 2001). Na maioria dos casos, as mãos, os pés e o rosto são afetados, acarretando modificações estéticas com impacto psicológico. Além disso, há relatos do uso tópico da DHA para proteção da pele de pessoas com doenças que não permitem exposição ao sol ou com manchas e, também, como auxiliar no tratamento fotoquimioterápico da psoríase (MISHRA *et al.*, 2008). Também foi descrito seu uso tópico no tratamento da porfíria variegata, um subgrupo hepático de porfíria, sendo essa uma deficiência enzimática na formação do grupo heme, acarretando no acúmulo de metabólitos intermediários deste (ASAWANONDA; OBERLENDER; TAYLOR, 1999). Estudos *in vivo* relataram sua ação na redução do ganho de peso, quando utilizada na suplementação alimentar de ratos (OBEID *et al.*, 2005). A diidroxiacetona também foi estudada quanto ao seu potencial de estimular a secreção de insulina, em células pancreáticas do tipo beta (JUNTTI-BERGGREN *et al.*, 2003). Além disso, há potencial aplicação em fármacos antimaláricos e anti tripanossômicos, visto que alguns estudos demonstraram que as aquaporinas presentes em *Trypanosoma brucei* são permeáveis a DHA. No entanto, tal protozoário parece não possuir enzimas responsáveis pela metabolização da mesma, o que a tornaria tóxica para essas células (UZCATEGUI *et al.*, 2007). Ainda há relatos do seu uso como antídoto contra envenenamento por cianeto, como antioxidante e como agente na melhoria da resistência aeróbica (NGUYEN; NEVOIGT, 2009). Estudo realizado por Stopiglia e colaboradores (2011) mostrou que a diidroxiacetona apresentou atividade antifúngica *in vitro* frente a 34 isolados de *Candida* spp. e 14 isolados de dermatófitos, sendo um desses o *Trichophyton rubrum*.

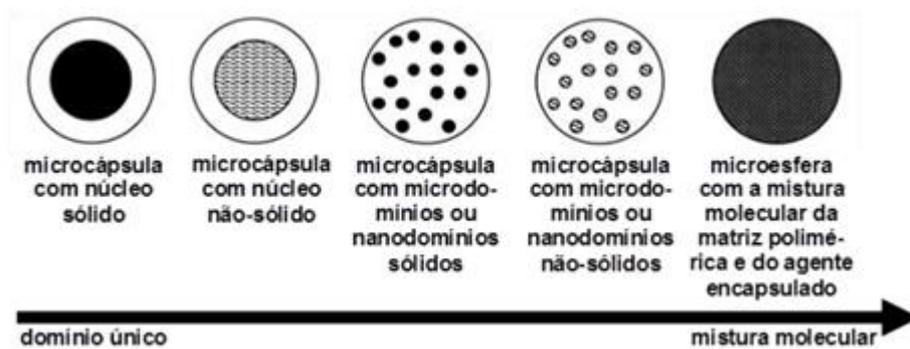
A DHA também encontra aplicação como intermediário na síntese de fármacos e outros produtos de química fina (MISHRA *et al.*, 2008). Os dois grupos funcionais hidroxila presentes em sua estrutura a tornam um interessante intermediário sintético para uma gama de compostos químicos. Pode ser citada a síntese do metotrexato, usado no tratamento quimioterápico do cancro (GATGENS *et al.*, 2007).

É possível sintetizar a DHA por via química ou eletrocatalítica, mas a via microbiana é a mais viável por apresentar baixo custo, condições brandas de realização do processo, processo ambientalmente limpo e a facilidade de purificação do produto (NGUYEN; NEVOIGT, 2009).

4.2 Micropartículas poliméricas

O termo micropartícula é resultante do tamanho dessas partículas que, geralmente, revelam um diâmetro médio entre 1 e 100 μm . Para a obtenção de micropartículas, é possível utilizar diversos polímeros com capacidade de liberar o fármaco por mecanismos de difusão e/ou de degradação (erosão) do material polimérico. Normalmente, as micropartículas podem ser divididas em dois tipos de estruturas, as microesferas e as microcápsulas (Figura 1) (MENDES, 2011), as microcápsulas são partículas constituídas por um núcleo interno que contém a substância ativa recoberta por uma camada de polímero de espessura variável e as microesferas, por sua vez, são sistemas matriciais constituídos por uma matriz polimérica no qual a substância carregada está uniformemente distribuída (PEREIRA *et al.*, 2006).

Figura 1: Modelos de estrutura das micropartículas



Fonte: Birnbaum & Brannom-Peppas (2003)

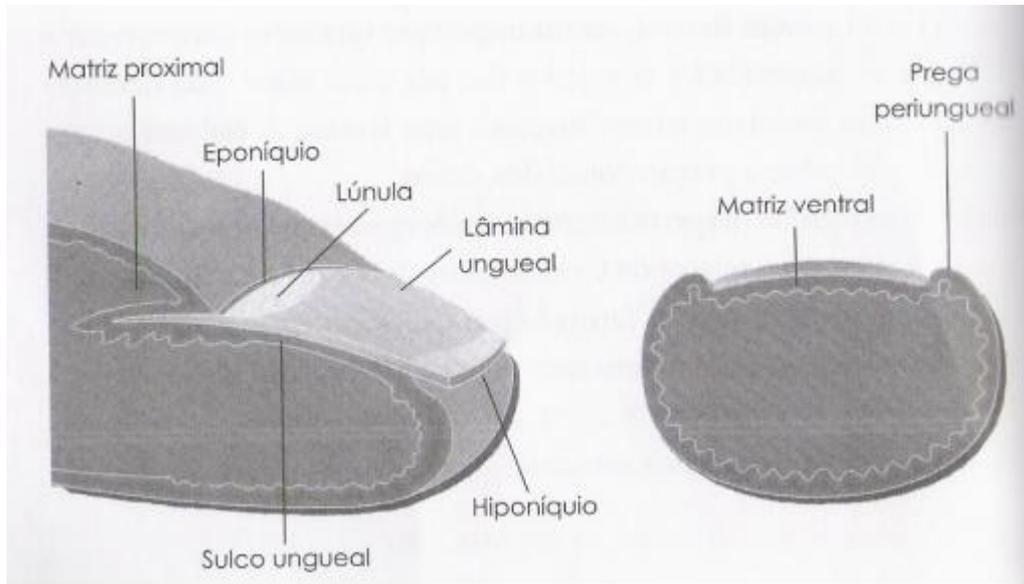
4.3 Onicomicose

4.3.1 Anatomia e composição da unha

Para compreender melhor a patogênese das onicomicoses é fundamental entender a estrutura da unha. De acordo com Gomes, Lencastre e Lopes (2012), a composição e as propriedades ungueais são constituídas por um conjunto de estruturas, onde cada uma tem sua função (Figura 2). A lâmina ungueal é composta por células epiteliais queratinizadas; a matriz ungueal é composta por um epitélio que fixa a unha ao seu leito e suas células produzem a queratina rígida do leito que é localizado entre a matriz e o hiponíquio, sendo esse último a porção entre a parte livre da placa e o sulco distal; o hiponíquio age principalmente como uma barreira de proteção, impedindo a entrada de agentes infecciosos na extremidade distal da unha. A parte proximal da unha é coberta por uma extensão de pele, que é protegida pelo eponíquio, também conhecida como cutícula, cuja função também é prevenir a entrada de

fungos e bactérias. A porção ventral da placa consiste de queratina flexível, que é produzida pelas células do leito, na qual está firmemente ligada (THOMAS *et al.*, 2010).

Figura 2- Composição estrutural da unha.



Fonte: Bega (2006).

4.3.2 Etiologia da onicomicose

A invasão da unidade ungueal por fungo é denominada onicomicose. O termo onicomicose é derivado do grego “onyx” (unha) e “mykes” (fungo) (KAUR; KASHYAP; BHALLA, 2008), a qual pode ser causada por fungos dermatófitos, leveduras e fungos filamentosos não dermatófitos. A onicomicose é considerada uma das dermatoses mais recorrentes, sendo responsável por 15 a 40 % das alterações ungueais. São classificadas clinicamente em onicomicose subungueal distal, onicomicose superficial branca, onicomicose proximal subungueal e onicomicose distrófica total (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA, 2018).

a) Onicomicose subungueal distal: É a forma mais comum da infecção. O organismo infectante invade o leito da unha, começando pelo hiponíquio e então migra para a região proximal da unha através da matriz subjacente. Ocorre uma hiperqueratose subungueal, causando o destacamento e a coloração amarelada da lâmina da unha Figura 3 (ATAÍDES, 2010);

Figura 3: Lesão subungueal distal



Fonte: Lima *et al.* (2007)

b) Onicomicose subungueal proximal: é o subtipo relativamente incomum, e ocorre quando o organismo infectante invade a unha pela região proximal através da área da cutícula, e migra para a região distal. As apresentações clínicas incluem hiperqueratose subungueal podendo observar uma reação inflamatória, onicólise proximal, leuconíquia e destruição da lâmina na região proximal - Figura 4 (ATAÍDES, 2010);

Figura 4: Lesão subungueal proximal



Fonte: Lima *et al.* (2007)

c) Onicomicose distrófica total: Representa a evolução das lesões, que se caracteriza pela fragilização e queda de todas as lâminas ungueais, persistindo apenas alguns restos de queratina aderida ao leito ungueal - Figura 5 (ATAÍDES, 2010);

Figura 5 – Lesão distrófica total



Fonte: Lima *et al.* (2007)

d) Onicomicose superficial branca: Os fungos invadem diretamente a camada superficial da camada da lâmina da unha, podendo ser reconhecida pela presença de uma região bem delimitada opaca na lâmina externa da unha, caracterizada pela localização superficial do fungo na superfície dorsal da lâmina ungueal. Quando a infecção progride, as regiões opacas coalescem e a unha se torna áspera e mole - Figura 6 (ATAÍDES, 2010).

Figura 6 – Lesão superficial branca



Fonte: Lima *et al.*, (2007)

4.3.3 Onicomicoses causadas por dermatófitos

Os dermatófitos são um grupo de fungos filamentosos que taxonomicamente classificam-se nos gêneros: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* (ELEWSKI, 1998) e caracterizam-se pela capacidade de invadir tecidos queratinizados como pele, pêlo e unhas, representam cerca de 70% das infecções humanas e acometem, preferencialmente, seres humanos e, raramente, animais. Exemplos de micro-organismos dessa classe são: *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton violaceum*, *Trichophyton soudanense* e *Trichophyton*

rubrum (COELHO *et al.*, 2008), sendo *Trichophyton rubrum* a espécie mais frequentemente encontrada em onicomicoses (HEIDRICH *et al.*, 2015).

4.3.4 Onicomicose causada por *Candida* spp.

O gênero *Candida* é constituído de aproximadamente 200 espécies diferentes de leveduras, que colonizam diversos sítios corpóreos, tais como, orofaringe, cavidade bucal, dobras da pele, secreções brônquicas, vagina, urina e fezes (SCHULZE *et al.*, 2009). Estes micro-organismos estão presentes na microbiota da pele e mucosas do homem, desde o nascimento, e sua relação de convivência com o hospedeiro ocorre durante toda vida. No entanto, quaisquer alterações na homeostase do organismo humano, como mudanças orgânicas, físico-químicas, fisiológicas ou patológicas tanto da pele como nas mucosas, favorecem a manifestação infecciosa deste fungo (RIBEIRO *et al.*, 2004).

A onicomicose por *Candida albicans* é comum em pessoas que têm as mãos imersas em água com frequência, sendo um grupo de risco as donas de casa, lavadeiras, jardineiros e cozinheiros. Esta infecção fúngica das unhas é muitas vezes acompanhada por paroníquia, uma infecção em torno da unha com um aspecto inchado e inflamado, podendo evoluir para oníquia que altera a formação da unha, que cresce ondulada e com alterações na superfície, ocorre com mais frequência nas unhas das mãos (ATAÍDES, 2010).

4.3.5 Epidemiologia

Na atualidade, ainda é desconhecida a real incidência e prevalência das onicomicoses nos brasileiros, pois esse tipo de doença não requerer notificação ao Sistema Único de Saúde (SUS). Existem alguns fatores que corroboram para esse tipo de doença: idade, classe social, ocupação, clima, ambiente onde vive e frequência de viagem (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA, 2018).

Mais que uma preocupação estética ou cosmética, essa infecção pode causar dor e desconforto, com impactos negativos na autoestima e bem estar do paciente, especialmente em idosos, diabéticos e imunocomprometidos. Além disso, outros membros da família podem ser infectados (LASENNA & TOSTI, 2015).

Algumas atividades do cotidiano também podem estar associadas com o aumento da incidência dessa doença, tais como: a profissão, o uso de sapatos e o cuidado das unhas em salões, que podem resultar no aparecimento de traumas e umidade excessiva (KAUR *et al.*, 2008). Quando as onicomicoses são associadas à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), considera-se clinicamente mais agressiva, com implicações incomuns da doença,

além de afetar a resistência ao tratamento convencional. Estima-se que cerca de 15 a 40% dos portadores de HIV são acometidos por onicomicoses, o que pode ser diretamente relacionado ao grau de imunossupressão (SURJUSHE *et al.*, 2007).

4.3.6 Diagnóstico de onicomicoses

A fim de selecionar um tratamento adequado contra as onicomicoses, é necessário estabelecer um diagnóstico correto, que possibilitara a prescrição de um tratamento antifúngico específico, justificando o uso racional de medicamentos que limita o desenvolvimento de resistência (TORRES-RODRÍGUEZ, 2006). Atualmente são mais utilizados os exames de microscopia direta e a cultura de fungos. O exame de diagnóstico por microscopia direta é um teste micológico rápido, que consiste na pesquisa de estruturas fúngicas em uma amostra de unha clarificada com hidróxido de potássio a 20%. Esse método pode fornecer cerca de 5 a 10% de resultados falso-negativos (COPETO, 2010), já o exame micológico cultural é uma técnica que consiste na semeadura da amostra em meio de cultura apropriado ao crescimento de fungos. Essa técnica demanda um maior tempo para a liberação do laudo, porém, apresenta resultados mais confiáveis quando se pretende estudar a morfologia microscópica dos fungos (SCOGNAMIGLIO *et al.*, 2010).

4.3.7 Tratamentos convencionais

Atualmente a terapêutica das onicomicoses está baseada em três tipos de tratamentos distintos: terapia tópica, terapia sistêmica e terapia combinada (tópica e sistêmica). Nestas terapias, alguns dos antifúngicos mais utilizados para tratamentos de infecções causadas por dermatófitos são: fluconazol, ciclopirox olamina, terbinafina, miconazol, itraconazol, tioconazol, cetoconazol e griseofulvina (MARTINS, 2016). No entanto, alguns fatores podem interferir na escolha do antifúngico e, conseqüentemente, na resposta terapêutica, como: adesão ao tratamento, possibilidade de interações medicamentosas, fatores relacionados ao estado clínico do paciente, fatores epidemiológicos e avaliação laboratorial (RAJAN & VASUDEVAN, 2012).

As terapias convencionais são eficazes contra dermatófitos, mas não é possível generalizar, em muitos casos pode ocorrer falha terapêutica. Contudo, não são efetivas para o tratamento de onicomicoses por fungos não dermatófitos, como é caso da griseofulvina que apresenta baixa afinidade pela queratina ungueal com taxa de cura de 25,5% (HARDMAN, LIMBIRD e GILMAN, 2005); O cetoconazol possui maior afinidade pela queratina, mas seus

efeitos colaterais são um dos limitantes da terapia (SALAS-CAMPOS, GROSS-MARTÍNEZ e CARRILO-DOVER, 2009); O itraconazol, tem uma eficácia maior frente o cetoconazol podendo chegar à 93% de cura nas unhas dos pés, porém, alguns estudos demonstram hepatotoxicidade (DELARZE & SANGLARD, 2015); A terbinafina apresenta ação fungistática, seus efeitos adversos são inferiores aos observados com a griseofulvina e comparados aos produzidos pelo itraconazol (DELL ROSSO, 2014).

As onicopatias também podem ser tratadas com o uso de ciclopirox olamina 8 % na forma de esmalte, permitindo a passagem transungueal na unha. Esta substância tem amplo espectro contra fungos, inibindo enzimas importantes para a síntese de proteínas e ácidos nucleicos (GHELARD *et al.*, 2014; MARTINEZ-ROSSI, PERES e ROSSI, 2008), porém como monoterapia possui eficácia menor que 50% nas onicomicoses das mãos e 25% nos pés (NEGRONI, 2008).

5. METODOLOGIA

5.1 Preparação das micropartículas de Diidroxiacetona

As formulações de micropartículas foram preparadas pelo método de aspersão (*spray drying*), utilizando Mini Spray Dryer Büchi® B-290. Para preparação das micropartículas, a diidroxiacetona e o polímero Eudragit® RS 100 foram dissolvidos em uma quantidade de etanol correspondente a 10% (v/v) do volume total da mistura de solventes. A mistura final foi obtida por agitação magnética e em seguida nebulizada, originando desse modo as micropartículas. O processo de aspersão ocorreu sob as seguintes condições operacionais: fluxo de alimentação de 3 mL/min, temperatura de entrada de 150°C e bico atomizador de 1,2 mm. A composição quali- quantitativa das formulações de micropartículas é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Composição quali-quantitativa das micropartículas de diidroxiacetona preparadas pelo método de aspersão.

Componentes	Quantidade
Diidroxiacetona	250mg
Eudragit® RS	500mg
Etanol:água (10:90) qsp	100mL

5.2 Rendimento

O rendimento do processo de preparação das micropartículas foi calculado somando-se a quantidade de todas as matérias-primas utilizadas para o preparo de cada formulação, excluindo-se o sistema solvente, e dividindo pela massa pesada após preparação das micropartículas, conforme descrito na Equação 1:

$$R(\%) = \frac{\text{Massa_pesada_final}}{\text{Massa_matérias_primas}} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

5.3 Análise granulométrica

O tamanho de partícula foi avaliado pela técnica de difratometria de laser utilizando o equipamento Mastersizer® 2000 (Malvern Instruments). Os dados de difração de laser obtidos foram avaliados utilizando o diâmetro médio baseado no volume da partícula, e ainda os valores de 10% ($d_{10\%}$), 50% ($d_{50\%}$) e 90% ($d_{90\%}$) da distribuição, que indicam a percentagem de partículas possuindo diâmetro igual ou inferior ao valor determinado. O valor

do Span (Equação 2), que é um indicativo da polidispersão do sistema, também foi utilizado para a caracterização das formulações.

$$Span = \frac{d_{90\%} - d_{10\%}}{d_{50\%}} \quad (\text{Eq. 2})$$

5.4 Preparo da base líquida espessada

Após o preparo das micropartículas, foi realizada a incorporação das mesmas em um gel de Kolliphor® P 188.

5.5 Ensaio *in vitro* de suscetibilidade fúngica às micropartículas

A sensibilidade do isolado *Candida albicans* 28367 ATCC frente às micropartículas de DHA produzidas foi avaliada pela técnica de microdiluição em caldo, segundo o protocolo M27-A3 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (CLSI, 2008). O inóculo fúngico foi realizado a partir de culturas de 24 horas e padronizado em espectrofotômetro em $\lambda=530\text{nm}$, com absorbância entre 0,08 e 0,1 para obtenção de aproximadamente $1-5 \times 10^6$ UFC/mL. Posteriormente, o padronizado foi diluído em caldo RPMI 1640 tamponado com 165 mM de ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) (SANCHOTENE *et al.*, 2017).

Foram realizadas diluições seriadas nas concentrações 50 a 1,6 mg/mL de micropartículas de DHA, DHA livre e micropartículas sem princípio ativo, em placas de 96 poços com fundo em U. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada como a menor concentração capaz de inibir totalmente o crescimento do micro-organismo. As micropartículas sem princípio ativo foram utilizadas como fármaco controle nas mesmas concentrações das demais. Todos os experimentos foram realizados em triplicada.

A Concentração Fungicida Mínima (CFM) foi definida como a menor concentração antifúngica capaz de matar as células fúngicas. Para determinação da CFM, uma alíquota de 10 μL dos poços em que não houve crescimento na técnica de microdiluição contendo a DHA livre ou micropartículas de DHA do teste de CIM, com concentrações iguais e maiores que a CIM, foi transferida para placas de Petri com ágar Sabouraud e incubada a 35°C por 7 dias. Os testes foram realizados em duplicata para o isolado fúngico.

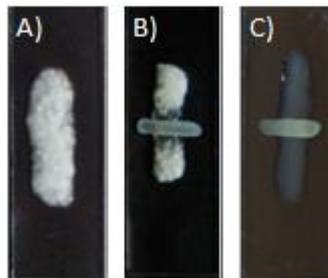
5.6 Ensaio *in vitro* de suscetibilidade fúngica ao gel de micropartículas

O estudo foi realizado com o isolado de *Candida albicans* 28367 ATCC, disponível na Micoteca do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Pampa, Campus

Uruguaiana-RS. O micro-organismo foi repicado em ágar Sabouraud dextrose e incubado a 35°C por 24 horas. Após este período, foi realizada a padronização do inóculo fúngico, em espectrofotômetro, para atingir uma concentração de 3×10^5 esporos/ mL, em caldo Sabouraud dextrose. Posteriormente, em lâminas de microscopia previamente esterilizadas, foram aplicadas alíquotas da suspensão fúngica, formando um filme em toda a superfície da lâmina e, em seguida, o gel contendo as micropartículas de DHA foi aplicado sobre a parte central do filme fúngico.

As concentrações das micropartículas utilizadas foram 1,6; 25 e 50 mg/mL. O resultado foi avaliado pela inibição do crescimento fúngico Figura 7 (Koroishi *et al.*, 2010). Esmalte de octopirox olamina foi utilizado como fármaco controle e o gel livre de fármaco foi utilizado como controle negativo (Koroishi *et al.*, 2010).

Figura 7: Exemplos de avaliação de resultados: A) controle de crescimento, B) inibição parcial do crescimento e C) inibição total do crescimento.



Fonte: Koroishi *et al.* (2010)

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Preparação das micropartículas de DHA

As micropartículas com Eudragit RS100 são úteis para encapsular fármacos lipofílicos ou hidrofílicos. Além disso, a secagem de micropartículas poliméricas utilizando a técnica de *spray-drying* é uma plataforma promissora para melhorar a estabilidade físico-química das formulações, ou ainda controlar sua liberação (GUTERRES, 2009). As micropartículas de DHA foram obtidas com sucesso seguindo a metodologia previamente descrita. As partículas foram obtidas a partir de uma emulsão preparada sob agitação e aquecimento e apresentaram coloração branca.

6.2 Rendimento

Os rendimentos obtidos foram de 20% para as formulações com DHA e sem DHA, obtidos pelo método de aspersão. Os motivos para o baixo rendimento podem ser a perda de pó que fica adsorvido na torre de secagem e ainda, parte dele é perdido pela parte superior do ciclone.

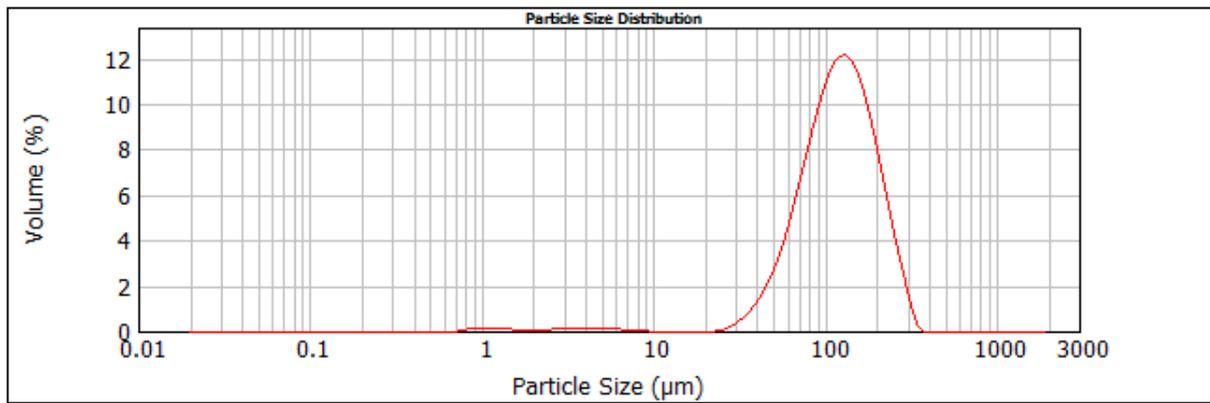
O ajuste da velocidade de alimentação é realizado com a finalidade de que o líquido presente nas gotículas evapore antes que estas entrem em contato com as paredes da câmara de secagem. Velocidades de alimentação excessivas conduzem à diminuição da temperatura de saída e ao acúmulo do material sobre as paredes da torre de secagem (MASTERS, 1985; RANKELL *et al.*, 2001). Alamilla-Beltran *et al.*, (2005), utilizando temperaturas mais baixas, observou partículas com menor tamanho, que se apresentaram com uma fina crosta, compacta e irregular.

6.3 Determinação do tamanho das partículas

Alguns fatores são de extrema importância para avaliar o tamanho das partículas produzidas, por exemplo: diâmetro médio de partícula, diâmetro médio do volume e polidispersão (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Logo, após a preparação das micropartículas, utilizando a técnica de difratometria de laser (DL), observamos que as micropartículas de DHA alcançaram o diâmetro médio de partícula ($D_{4,3}$) de 130,149 μm e o diâmetro médio do volume ($d_{0,5}$) de 120,672 μm (Figura 8). Estes valores representam uma singularidade na forma estrutural destas micropartículas. Além disso, as mesmas também apresentaram uma baixa polidispersão (Span) no valor de 1,299, caracterizando homogeneidade. Ou seja, a formulação foi considerada adequada em nosso estudo, pois, o tamanho médio da população

de partículas foi micrométrica segundo estudo de RAFFIN *et al.* (2007), indicando uma melhora nas propriedades físico-químicas em relação a DHA livre.

Figura 8: Tamanho de distribuição das micropartículas de DHA, avaliado pela técnica de difratometria de laser utilizando o equipamento Mastersizer® 2000 (Malvern Instruments).



6.4 Concentração Inibitória Mínima

Na Tabela 2 estão expressos os resultados de CIM e CFM obtidos para as micropartículas de DHA e DHA livre no ensaio de microdiluição em placa. A CIM apresentou as mesmas concentrações para DHA livre e para MpDHA. Os valores encontrados para DHA livre estão na mesma faixa dos descritos por Stopiglia e colaboradores (2011), onde a DHA apresentou atividade antifúngica *in vitro* frente a diversas cepas de *Candida spp.*, na faixa de 1,6 a 50mg/mL.

No entanto, era esperado um melhor resultado de atividade da MpDHA, como descrito por Fernandes (2008), nos resultados *in vitro* da avaliação de atividade antifúngica de *Lippia sidoides*, na qual, o ativo encapsulado apresentou maior atividade antifúngica frente ao controle positivo. Estudo de Carneiro e colaboradores (2013) mostrou que as micropartículas poliméricas de peróxido de benzoíla foram capazes de reduzir os efeitos colaterais e prolongaram o efeito terapêutico do fármaco, além disso, a microencapsulação também promoveu a amorfização do fármaco e prolongou sua liberação sem alterar a cinética de liberação.. No entanto, para Mirante *et al.* (2015), é necessário uma otimização do processo de obtenção das micropartículas para que as mesmas sejam consideradas como uma alternativa a novas terapias medicamentosas. As micropartículas tem alto potencial para melhorar a funcionalidade de ativos em novas formulações. Contudo, no presente estudo, as

micropartículas utilizadas foram testadas pela técnica de microdiluição em caldo, que por não reproduzir os tecidos nos quais o agente antifúngico será empregado, pode não ser o melhor método para análise de formulações microencapsuladas.

Por outro lado, a CFM apresentou uma melhor atividade das MpDHA em relação à DHA livre. Esse aumento na eficácia dos sistemas microparticulados pode ser explicado pela tendência que os polímeros têm de adsorver na interface, devido aos mecanismos eletrostáticos e às suas propriedades superficiais hidrofóbicas. O tamanho reduzido das partículas favorece a deposição de um maior número de partículas na superfície, expondo assim, uma maior quantidade de substância ativa.

Tabela 2: Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) de *Candida albicans* 28367 ATCC frente a diidroxiacetona (DHA) na forma livre e microencapsulada.

	Microcápsula DHA (mg/mL)	DHA livre (mg/mL)
CIM	1,56	1,56
CFM	6,25	50,00

6.5 Ensaio *in vitro* de sensibilidade antifúngica ao gel de micropartículas

Não conseguiu-se obter crescimento fúngico no ensaio *in vitro* de sensibilidade antifúngica ao gel de micropartículas, seguindo a metodologia proposta e, conseqüentemente, não foram obtidos resultados conclusivos. Dessa forma é essencial a necessidade de refazer o teste com algumas mudanças na técnica de aplicação, pois o gel pode apresentar importantes características antifúngicas que ainda não puderam ser avaliadas.

7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

De acordo com os resultados desse estudo, conclui-se que as micropartículas de DHA alcançaram um tamanho ideal, mantendo um formato regular. Além disso, a atividade antifúngica *in vitro* quanto à inibição do crescimento microbiano foi mantida, enquanto que o efeito fungicida foi potencializado pelas micropartículas em relação ao fármaco livre.

Faz-se necessário realizar mais testes a fim de se esclarecer totalmente a atividade antifúngica das micropartículas de DHA e avaliar o efeito do gel, pois não foi considerada a ação do mesmo, além de avaliar a atividade antifúngica frente a fungos dermatófitos e frente a um número maior de isolados de *Candida* spp. Isto possibilitará que novas formulações ou compostos responsáveis pela ação antifúngica possam ser mais uma alternativa frente às onicomicoses.

8. REFERÊNCIAS

- Alamilla-Beltran, Liliana et al. Description of morphological changes of particles along spray drying. **Journal of Food Engineering**, v. 67, n. 1-2, p. 179-184, 2005.
- Asawanonda, P.; Oberlender, S.; Taylor, C. The use of dihydroxyacetone for photoprotection in variegated porphyria. **International Journal of Dermatology**, v. 38, n. 12, p. 916-8, Dec 1999.
- Ataídes, F. S. Isolamento, identificação e suscetibilidade in vitro de fungos causadores de Onicomicose. Dissertação (Mestrado) – **Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública**, Goiânia, 2010.
- Bega, A. Tratado de podologia. **Yendis**: São Paulo, 2006.
- Carneiro, Jaqueline et al. Desenvolvimento e avaliação de micropartículas poliméricas contendo peróxido de benzoíla. 12º Congresso Brasileiro de Polímeros ;**12º CBPol**. 2013.
- Ciriminna, R.; Palmisano, G.; Della Pina, C.; Rossi, M. e Pagliaro, M., One-pot electrocatalytic oxidation of glycerol to DHA, **Tetrahedron Letters** v.47 p.6993–6995, 2006.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast. **3rd ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute**. (Document M27-A3), 2008.
- Coelho, A. C. et al. Isolamento de dermatófitos em animais domésticos em Vila Real, Portugal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 4, p. 1017–1020, 2008.
- Copeto, S. C. M. F. Contribuição para o diagnóstico molecular das onicomicoses. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) - Instituto de Higiene e Medicina Tropical, **Universidade Nova Lisboa**, Lisboa, 116 p, 2010.
- Delarze, Eric; Sanglard, Dominique. Defining the frontiers between antifungal resistance, tolerance and the concept of persistence. **Drug Resistance Updates**, v. 23, p. 12-19, 2015.
- Dell Rosso, J. Q. The role of topical antifungal therapy for onychomycosis and the emergence of newer agents. **The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology**, v.7 n.7 p.10-18, 2014.
- Elewski, B. E. Onychomycosis: pathogenesis, diagnosis, and management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 415-29, Jul 1998.
- Feng, J.; Zhang, X.; Zhuo, R.; Construction of functional aliphatic polycarbonates for biomedical applications; **Progress in Polymer Science**. v.37, p.211– 236, 2012.
- Fernandes, Luciana Pinto. Desenvolvimento tecnológico de produtos particulados obtidos a partir de *Lippia sidoides* pela técnica de spray drying e avaliação das propriedades antifúngicas. Tese de Doutorado. **Universidade de São Paulo**. 2008.
- Fesq, H. et al. Dihydroxyacetone in a new formulation--a powerful therapeutic option in vitiligo. **Dermatology**, v. 203, n. 3, p. 241-3, 2001.

Fusaro, R. M.; Rice, E. G. The maillard reaction for sunlight protection. **Annals of The New York Academy of Sciences**, v. 1043, p. 174-83, Jun 2005.

Gatgens, C. et al. Biotransformation of glycerol to dihydroxyacetone by recombinant *Gluconobacter oxydans* DSM 2343. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 3, p. 553-9, Sep 2007.

Ghelardi, Emilia et al. Potential of ergosterol synthesis inhibitors to cause (cross) resistance in *Trichophyton rubrum*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, p. AAC. 02382-13, 2014.

Gomes, Susana; Lencastre, André; Lopes, Maria João Paiva. Alterações ungueais em Pediatria. **Nascer e Crescer**, v. 21, n. 1, p. 19-24, 2012.

Guterres, Silvia Stanisçuaski; Beck, Ruy Carlos Ruver; Pohlmann, Adriana Raffin. Spray-drying technique to prepare innovative nanoparticulated formulations for drug administration: a brief overview. **Brazilian Journal of Physics**, v. 39, n. 1A, p. 205-209, 2009.

Hardman, J. G.; Limbird, L. E.; Gilman, A. G. As bases farmacológicas da terapêutica. (Ed.). **Goodman & Gilman**. Tradução para o português: Carla de Mello Vorsatz et al. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 1615p. 2005.

Heidrich, D. et al. Dermatophytosis: a 16-year retrospective study in a metropolitan area in southern Brazil. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 8, p. 865-71, Aug 2015.

Hu, Z. C.; Zheng, Y. G. Enhancement of 1,3-dihydroxyacetone production by a UV-induced mutant of *Gluconobacter oxydans* with DO control strategy. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 165, n. 5-6, p. 1152-60, Nov 2011.

INCA - Instituto Nacional De Câncer José Alencar Gomes Da Silva. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/>> acesso: 25/06/2018.

Juntti-Berggren, L. et al. Dihydroxyacetone-induced oscillations in cytoplasmic free Ca²⁺ and the ATP/ADP ratio in pancreatic beta-cells at substimulatory glucose. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 42, p. 40710-6, Oct 17 2003.

Kaur, R.; Kashyap, B.; Bhalla, P. Onychomycosis--epidemiology, diagnosis and management. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 108-16, Apr-Jun 2008.

Kioshima, E.S.; Oliveira, A.C.P.; Svidzinski, T.I.E. Onicomicoses: do diagnóstico ao tratamento. **Arquivo de Ciências da Saúde da Unipar**, v.6 p.159-163,2002.

Koroishi, A.M; Sehn, E; Baesso, M.L; Ueda-Nakamura, T; Nakamura, C.V; Cortez, D.A.G; Filho, B.P.D. Antifungal activity and nail permeation of nail lacquer containing *piper regnellii* (miq.) c. cd. var. *pallescens* (c. dc.) yunck (piperaceae) leave extracts and derivatives. **Molecules**, v.15, p.3920-3931. 2010.

Lasenna, C. E.; Tosti, E. Patient considerations in the management of toe onychomycosis - role of efinaconazole. **Patient Preference and Adherence**, v.9 p.887- 891, 2015.

Levy, S. B.; Cosmetics that imitate a tan, **Dermatologic Therapy**, vol 14, p.215-219, 2001.

Lima, K. M.; Rêgo, R. S. M. e Montenegro, F. Diagnósticos Clínicos e Laboratoriais das Onicomicoses. **NewsLab** - edição 83, 2007.

Martinez-Rossi, N. M.; Peres, N.; Rossi, A. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. **Mycopathologia**, 166 p.369-383, 2008.

Martins, F. J. Atividade antifúngica de compostos derivados do ácido cinâmico no tratamento da onicomicose. Tese de Doutorado do curso de PósGraduação em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia, para obtenção do Título de Doutor em Genética e Biotecnologia. **Universidade Federal de Juiz de Fora**, 2016.

Masters, Keith et al. Spray drying handbook. **Spray drying handbook.**, 1985.

Mendes J.B.E.; Desenvolvimento e avaliação de micropartículas poliméricas contendo resveratrol. Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na **Universidade Estadual de Ponta Grossa**, 2011.

Menezes, E. A.; Mendes, L. G e Cunha, F. A. Resistência a antifúngicos de *Candida tropicalis* isoladas no Estado do Ceará, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 42 p.354-355, 2009.

Mirante, Daiane Cristine et al. Desenvolvimento Tecnológico e Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Micropartículas de Polilisina e de Nanocápsulas contendo óleo essencial de *Melaleuca Alternifolia* Cheel (Myrtaceae). 2015.

Mishra, R.; Jain, S. R.; Kumar, A. Microbial production of dihydroxyacetone. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 4, p. 293-303, Jul-Aug 2008.

Negróni, R. Tratamento de las onicomicosis. **Revista de Patologia Tropical**, 37 p. 89-109, 2008.

Nguyen, H. T.; Nevoigt, E. Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of dihydroxyacetone (DHA) from sugars: a proof of concept. **Metabolic Engineering**, v. 11, n. 6, p. 335-46, Nov 2009.

Obeid, O. A. et al. Effect of diet supplementation with glutamine, dihydroxyacetone, and leucine on food intake, weight gain, and postprandial glycogen metabolism of rats. **Nutrition**, v. 21, n. 2, p. 224-9, Feb 2005.

Pereira, M. et al. Micropartículas Secas contendo Fármaco Modelo Lipofílico preparadas a partir de Suspensão Aquosa: Estudo de Formulação. **Acta Farmaceutica. Bonaerense**, v. 25, n. 2, p.198-205, Jul 2006.

Petersen, A. B. et al. Dihydroxyacetone, the active browning ingredient in sunless tanning lotions, induces DNA damage, cell-cycle block and apoptosis in cultured HaCaT keratinocytes. **Mutat Res**, v. 560, n. 2, p. 173-86, Jun 13 2004.

Raffin, Renata Platchek et al. Enteric controlled-release pantoprazole-loaded microparticles prepared by using eudragit S100 and poly (ϵ -caprolactone) blend. **Pharmaceutical development and technology**, v. 12, n. 5, p. 463-471, 2007

Rajan, R.; Vasudevan, D. T. Effect of permeation enhancers on the penetration mechanism of transdermal gel of ketoconazole. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 3, n. 2, p. 112-6, Apr 2012.

Rankell, A. S.; Lieberman, H. A.; Schiffman, R. F. Secagem. Lachman L, Lieberman HA, Kanig JL. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**, v. 1, p. 83-112, 2001.

Ribeiro EL, Guimaraes RI, Inácio MCC, et al. Aspectos das leveduras de *Candida* vinculadas as infecções nosocomiais. **News Lab**;v.34 . 2004.

Rossi T, Lozovoy MAB, Silva RV, et al. Interações entre *Candida albicans* e Hospedeiro. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina. 2011.

Salas-Campos, I.; Gross-Martínez, N.; Carrillo-Dover, P. Onicomycosis por hongos fuliginosos. **Acta Médica Costarricense**, 52 p.241-244, 2009.

Sanchotene, Karine Ortiz et al. In vitro susceptibility of *Sporothrix brasiliensis*: Comparison of yeast and mycelial phases. **Medical mycology**, v. 55, n. 8, p. 869-876, 2017.

Santos A. B.; Trindade C. S. F.; Grosso C. R. F.; Preparo e caracterização de microcápsulas de oleoresina de páprica obtidas por atomização. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 25 p.322-326, 2005.

Schaffazick, S. R., Pohlmann, A. R., Dalla-Costa, T., & Guterres, S. S. Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. **Eur J Pharm Biopharm**, 56(3), p.501-505. 2003.

Schulze J, Sonnenborn U. Yeasts in the gut: from commensals to infectious agents. **DtschArztebl Int**;106 p.837–842. .2009.

Scognamiglio, T. et al. Comparison of inhibitory mold agar to sabouraud dextrose agar as a primary medium for isolation of fungi. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 1924–1925, 2010.

Seneviratne, C. et al. In vitro glycation of human serum albumin by dihydroxyacetone and dihydroxyacetone phosphate. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 417, n. 2, p. 817-23, Jan 13 2012.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA. **Manual de conduta nas onicomicoses: Diagnóstico e tratamento.** Disponível em: <<http://www.saudedireta.com.br/docsupload/1365643182manual-onicomicoses.pdf>> Acesso em 25 de abril. 2018.

Stopiglia, C.D.O.; Vieira, F.J.; Mondadori, A.G.; Oppe, T.P.; Scroferneker, M.L.; *In Vitro* Antifungal Activity of Dihydroxyacetone Against Causative Agents of Dermatomycesis, **Mycopathologia** 171 p.267–271, 2010.

Surjushe, A. et al. A clinical and mycological study of onychomycosis in HIV infection. **Indian Journal of Dermatology Venereology and Leprology**, v. 73, n. 6, p. 397-401, Nov-Dec 2007.

Thomas, J. et al. Toenail onychomycosis: an important global disease burden. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 35, n. 5, p. 497-519, Oct 2010.

Torres-Rodríguez, J. M. Diagnóstico microbiológico de las micosis cutáneas superficiales. **Medicina Clínica**, v. 126, n. 1, p. 25–29, 2006.

Uzcategui, N. L. et al. Antiproliferative effect of dihydroxyacetone on *Trypanosoma brucei* bloodstream forms: cell cycle progression, subcellular alterations, and cell death. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 11, p. 3960-8, Nov 2007.