

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA  
CURSO DE FARMÁCIA**

**BÁRBARA MARMOR BACHINSKI**

**DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÃO CONTENDO ÓLEO DE *Melaleuca  
alternifolia* E TERBINAFINA DESTINADO À INFECÇÕES FÚNGICAS  
TÓPICAS**

**Uruguaiana/RS  
2022**

**BÁRBARA MARMOR BACHINSKI**

**DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÃO CONTENDO ÓLEO DE *Melaleuca alternifolia* E TERBINAFINA DESTINADO À INFECÇÕES FÚNGICAS TÓPICAS**

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

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Leticia Marques Colomé

**Uruguaiana/RS  
2022**



**BÁRBARA MARMOR BACHINSKI**

**DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÃO CONTENDO ÓLEO DE *Melaleuca alternifolia* DESTINADO À INFECÇÕES FÚNGICAS TÓPICAS**

Projeto de Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Farmácia da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Farmácia.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido em: 05/08/22 Banca examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Letícia Marques Colomé Orientadora  
UNIPAMPA

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Eduardo André Bender  
UNIPAMPA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Bruxel  
UNIPAMPA

*A Deus, por sempre me fazer capaz. Aos meus amados pais, João e Denise, maiores incentivadores e fontes inesgotáveis de apoio, amor e compreensão.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida, por permitir que até aqui eu chegasse.

Aos meus pais, João e Denise, pelo ensinamento de vida, por apoiar minhas escolhas, mesmo que elas me levem para longe de casa, por entenderem minha ausência, por sempre estarem de braços abertos me esperando. Amo vocês.

À minha irmã, Maria Vitória, por ser minha companheira de estudos, dividir comigo as tarefas de casa e me apoiar nas decisões, te amo.

Aos meus pastores, Edson e Rose, que torceram e oraram por mim durante as madrugadas.

Ao meu namorado Rafael, pelas palavras de encorajamento, pelas orações, compreensão, principalmente durante a escrita deste trabalho

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Letícia Marques Colomé, minha orientadora, pelos ensinamentos repassados e pelas oportunidades de aprender mais, pela paciência comigo e não desistir de mim nessa caminhada.

À Estefany pelo companheirismo e amizade, espero que nossa caminhada juntas, não termine por aqui.

A todos do LABNANO, pelo apoio, pela convivência em especial, Riciele, pela ajuda e pelas risadas garantidas, por me passar parte do conhecimento para conclusão deste projeto.

À Tamara pela ajuda com o doseamento.

“É impossível avaliar a força que possuímos sem medir o tamanho do obstáculo que podemos vencer, nem o valor de uma ação sem sabermos o sacrifício que ela comporta.”

H. W. Beecher

## RESUMO

A busca por antimicrobianos alternativos capazes de ultrapassar a estrutura composta pela unha continua sendo um grande desafio para o tratamento das infecções fúngicas ungueais. Uma estratégia promissora para controlar essas infecções pode estar baseada no uso de compostos naturais. Os óleos essenciais, extraídos de plantas aromáticas são agentes antimicrobianos bem conhecidos, caracterizados por um amplo espectro de atividades, incluindo propriedades antifúngicas. O tea tree oil (TTO) é óleo essencial volátil derivado principalmente da planta nativa australiana *Melaleuca alternifolia*. Muito empregado por suas propriedades antimicrobianas, o TTO é incorporado como ingrediente ativo em muitas formulações tópicas. Este óleo tem como principal constituinte o terpinen-4-ol, ao qual atribui-se amplo espectro de atividade antimicrobiológica, bem como, atividade antifúngica. O cloridrato de terbinafina (TBF) é um fármaco pertencente à classe das alilaminas, com atuação sobre a enzima epoxidase da célula fúngica, especialmente indicada para infecções cutâneas produzidas por fungos. Entre as estratégias que podem reduzir as doses de ativos e permitir a penetração cutânea do TBF associada ao TTO, destacam-se as nanoemulsões (NE). Caracterizada como um sistemas heterogêneos, as NE são compostas por um líquido (a fase interna) disperso em outro (a fase externa) na forma de gotículas, na presença de um agente emulsionante, que devido ao seu tamanho da partícula, promove uma melhor adesão ao tecido queratinizado da unha. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar nanoemulsões contendo diferentes concentrações de TTO (1,6; 2,4 e 3,2 mg/mL) e associado ao TBF destinadas ao uso tópico. As NE foram preparadas pela técnica de emulsificação espontânea. As formulações foram caracterizadas quanto à distribuição do tamanho de gotícula por difratometria de laser. As NE apresentaram perfil de distribuição monomodal em escala nanométrica, com diâmetro médio de 371 nm, 449 nm e 400 nm e valor de Span (polidispersão) de 0,556, 0,573 e 0,576, sendo considerados adequados para o uso pretendido. Experimentos futuros serão realizados com objetivo de avaliar a atividade microbiológica da associação TTO -



TBF contida em NE.

**Palavras-chave:** nanoemulsão; óleo de melaleuca; cloridrato de terbinafina; infecções fúngicas.

## ABSTRACT

The search for alternative antimicrobials capable of surpassing the structure composed by the nail remains a great challenge for the treatment of fungal nail infections. A promising strategy to control these infections may be based on the use of natural compounds. Essential oils, extracted from aromatic plants, are well-known antimicrobial agents characterized by a broad spectrum of activities, including antifungal properties. Tea tree oil (TTO) is a volatile essential oil derived primarily from the native Australian plant *Melaleuca alternifolia*. Widely used for its antimicrobial properties, TTO is incorporated as an active ingredient in many topical formulations. This oil has terpinen-4-ol as its main constituent, which has a broad spectrum of antimicrobial activity, as well as antifungal activity. Terbinafine is a drug belonging to the allylamine class, acting on the epoxidase enzyme of the fungal cell, especially indicated for skin infections caused by fungi. Among the strategies that can reduce the doses of actives and allow the cutaneous penetration of terbinafine associated with TTO, nanoemulsions (NE) stand out. Characterized as a heterogeneous system, NE are composed of a liquid (the internal phase) dispersed in another (the external phase) in the form of droplets, in the presence of an emulsifying agent, which, due to its particle size, promotes better adhesion to the keratinized tissue of the nail. Thus, the objective of this work was to develop and characterize nanoemulsions containing different TTO concentrations (1.6, 2.4 e 3.2 mg.mL<sup>-1</sup>) combined to terbinafine intended for topical use. The NE were prepared by the spontaneous emulsification technique. The formulations were characterized for droplet size distribution (laser diffractometry). The NE showed a monomodal distribution profile on the nanometer scale, with an average diameter of 371 nm, 449 nm and 400 nm and a Span value (polydispersion) of 0.556, 0.573 and 0.576, being considered suitable for the intended use. Future experiments will be carried out to evaluate the microbiological activity of TTO and terbinafine contained in NE.

**Keywords:** nanoemulsion; tea tree oil; terbinafine; fungal infections.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura da unha humana. Fonte: Adaptado de MCGRATH e UITTO (2010).....	19
Figura 2 - Desenho esquemático dos sistemas nanoestruturados: (a) lipossoma; (b) nanoemulsão; nanopartícula lipídica sólida; (d) carreador lipídico nanoestruturado; (e) nanocápsula e; (f) nanoesfera.....	24
Figura 3 - Esquema representativo do processo de preparação das NE pelo método de emulsificação espontânea (a) Preparação da fase orgânica sob agitação . (b) Preparação da fase aquosa em agitação. (c) Fase orgânica sendo dispersa na fase aquosa.....	26
Figura 4 - Características da NE.....	30
Figura 5 - Perfil de distribuição monomodal NE1.....	31
Figura 6 - Perfil de distribuição monomodal NE2.....	32
Figura 7 - Perfil de distribuição monomodal NE1.....	32
Figura 8 - Perfil cromatográfico do TBF em solução de metanol (5 µg/mL) utilizando uma coluna RP-18 (150mm x 4,6 mm, 5 µm). Fase móvel constituída por metanol e acetonitrila, na proporção 50:50 (v/v). Comprimento de onda: 224 nm. Fluxo 0,4 mL/min.....	33

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição quali-quantitativa das nanoemulsões contendo cloridrato de terbinafina associados ou não com óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> .....	26
Tabela 2 - Difractometria de laser e Span.....	31
Tabela 3 - pH de nanoemulsões contendo TTO em diferentes concentrações e cloridrato de terbinafina.....	33
Tabela 4 - Doseamento cloridrato de terbinafina em nanoemulsão contendo óleo de melaleuca.....	35
Tabela 5 - Valores de eficiência de encapsulação.....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

EE - Eficiência de Encapsulação

EHL - Equilíbrio Hidrófilo Lipófilo

ISO - International Organization for Standardization

NE - Nanoemulsão

pH - Potencial Hidrogeniônico

TBF - Cloridrato de terbinafina

TTO - Tea Tree Oil

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	17
2.1 Objetivo Geral.....	17
2.2 Objetivos Específicos.....	17
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
3.1 Infecções fúngicas.....	18
3.2 Unidade ungueal.....	18
3.3 Onicomicose.....	19
3.4 Cloridrato de terbinafina.....	20
3.5 Óleos essenciais: Aspectos importantes e características gerais.....	21
3.5.1 Óleo essencial de <i>Melaleuca</i> .....	22
3.6 Nanopartículas.....	23
3.7 Nanoemulsões.....	24
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	25
4.1 Preparo das nanoemulsões.....	25
4.2 Caracterização físico-química de nanoemulsões contendo óleo de <i>Melaleuca alternifolia</i> e cloridrato de terbinafina.....	27
4.2.1 Determinação da distribuição e do tamanho das partículas.....	27
4.2.2 Determinação de pH.....	28
4.3 Determinação do teor de TBF nas NE.....	28
4.4 Determinação de EE do fármaco.....	29
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	30
5.1 Preparo das nanoemulsões.....	30
5.2 Caracterização físico-química de nanoemulsões contendo óleo de <i>Melaleuca alternifolia</i> e cloridrato de terbinafina.....	30
5.2.1 Determinação da distribuição do tamanho das partículas.....	30
5.2.2 Determinação de pH.....	33
5.3 Determinação do teor de TBF nas NE.....	34
5.4 Determinação de EE do fármaco.....	35

<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>36</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>37</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Existem inúmeras doenças que afetam exclusivamente a unha, dentre elas, as onicomicoses que acometem cerca de 20% da população (ELKEEB et al., 2010).

A unha é uma barreira bastante eficiente à penetração de fármacos, caracterizada por uma estrutura rígida, coesa, e que não possui rotas alternativas a penetração de substâncias (diferentemente de outras barreiras, que apresentam anexos, como folículos pilosos no caso da pele) (NAIR et al., 2009). Estas características, dificultam a penetração dos fármacos para os estratos mais profundos da unha.

Os óleos essenciais são conhecidos pelas suas propriedades bactericidas e fungicidas e pelas suas propriedades medicinais (BAKKALI et al., 2008). Dentre as possibilidades terapêuticas derivadas das plantas para redução da prevalência das infecções fúngicas, destaca-se o óleo essencial de Melaleuca. *Melaleuca alternifolia* (árvore do chá) é uma pequena árvore da família Myrtaceae nativa da Austrália. O óleo essencial derivado da árvore do chá (*tea tree oil* - TTO) produzido a partir de suas folhas, pode ser classificado em três quimiotipos principais: terpinen-4-ol, terpinoleno e 1,8-cineol (PADOVAN et al., 2017).

Empregado em grande parte por suas propriedades antimicrobianas, o TTO é incorporado como ingrediente ativo em muitas formulações tópicas usadas para tratar infecções cutâneas (CARSON, 2006).

Considerando as infecções cutâneas fúngicas, os tratamentos tópicos convencionais, de um modo geral, mostram-se úteis em casos de infecções fúngicas superficiais, isto é, aquelas limitadas ao estrato córneo, à mucosa escamosa ou à córnea, porém as infecções fúngicas ungueais são de difícil tratamento com a administração tópica de agentes antifúngicos.

Dentre os agentes antifúngicos disponíveis, a TBF é uma alilamina sintética, estruturalmente semelhante ao agente tópico naftifina. Ela atua inibindo a esqualeno epoxidase fúngica, reduzindo, dessa forma, a biossíntese do ergosterol



(BRUM *et al.*, 2018).

Nanoemulsões (NE) são definidas como sistemas heterogêneos nos quais um líquido (a fase interna) é disperso em outro (a fase externa) na forma de gotículas, na presença de um agente emulsionante. As nanoemulsões são sistemas cineticamente estáveis e apresentam diversas potencialidades como sistemas carreadores de fármacos. A biocompatibilidade das matérias-primas empregadas para a sua obtenção torna estes sistemas uma alternativa promissora para veiculação tópica do TBF em associação com TTO, possibilitando a penetração mais profunda do fármaco nas lesões hiperqueratinizadas da unha.

Assim, o desafio desta proposta reside na preparação de nanoemulsões contendo TBF em associação com TTO, para que, futuramente, esse sistema possa ser avaliado na placa ungueal.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Realizar o desenvolvimento e a caracterização de uma nanoemulsão contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* e cloridrato de terbinafina, a fim de constituir uma formulação visando apresentar melhor permeabilidade na placa ungueal e aumentar o efeito antifúngico.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Desenvolver uma nanoemulsão contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* e cloridrato de terbinafina;
- Avaliar parâmetros físico químicos, tais como diâmetro, distribuição de tamanho de partículas e pH;

- Realizar o doseamento e avaliação da eficiência de encapsulação da cloridrato de terbinafina nas nanoestruturas.

### **3. REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1 Infecções fúngicas**

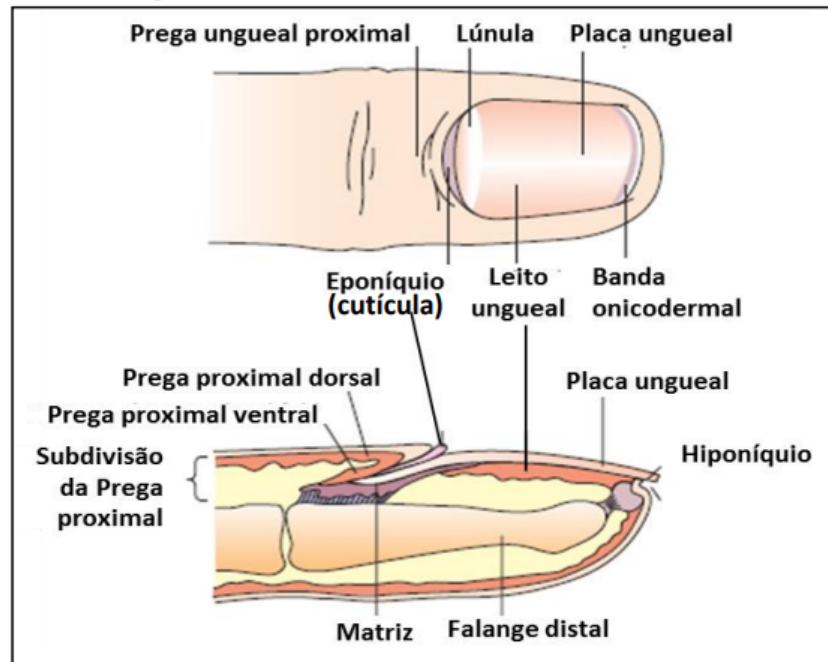
As dermatofitoses, especificamente, as onicomicoses são infecções fúngicas comuns em países de clima tropical, onde o calor e a umidade são frequentes a maior parte do ano, pois estes fatores são fundamentais no desenvolvimento de tais patologias (MAHFOUZ, 2012).

As infecções fúngicas humanas são denominadas micoses. Podem ser causadas por fungos patogênicos primários ou oportunistas. Os primários invadem o tecido do homem imunocompetente ou não, e os oportunistas são invasores principalmente em condições de imunodeficiência. A maioria dos fungos patogênicos vivem como saprófita na natureza, com exceção de poucos que também fazem parte da flora normal do homem, como *Malassezia* spp. e *Candida* spp (MEZZARI *et al.*, 2012).

#### **3.2 Unidade ungueal**

A unha é uma estrutura que cobre o dorso da falange distal (Baran & Nakamura, 2012). A estrutura da unha é formada pela placa ungueal e por quatro estruturas epiteliais: a prega proximal, a matriz, o leito ungueal, e o hiponíquio (Figura 1) (FLECKMAN e ALLAN, 2001; VEJNOVIC *et al.*, 2010; MURDAN, 2002). Os quatro componentes epiteliais têm funções vitais na manutenção da integridade da unha (CASHMAN e SLOAN, 2010).

**Figura 1** - Estrutura da unha humana.



Fonte: Adaptado de MCGRATH e UITTO (2010).

### 3.3 Onicomicose

As onicomicoses se caracterizam como infecções fúngicas comuns, crônicas, altamente resistentes, em que as unhas afetadas se apresentam com aspecto frágil, engrossado, sem cor, e friáveis (MUKHERJEE et al., 2011).

São infecções frequentemente causadas por dermatófitos, tais como *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes* em aproximadamente 85% dos casos, podendo também ser causadas por fungos não dermatófitos em 15% dos casos, como pela *Candida albicans* e raramente por outras leveduras (HAO et al, 2009; MUKHERJEE et al, 2011).

Os dermatófitos são parasitas restritivos de tecidos queratinizados. Portanto, podem ser encontrados no leito e na placa ungueal. No interior desses tecidos, o fungo existe apenas como micélio e artroconídeo, impossibilitando assim a

identificação precisa das espécies infectantes através da microscopia da unha, sendo necessária a combinação das técnicas, realizando a cultura ou a técnica de microcultivo em lâmina (RUIZ e CHIACCHIO, 2004; HAY e ASHBEE, 2010).

As baixas taxas de cura associadas à onicomicose são o reflexo das dificuldades existentes no tratamento. Os fármacos tópicos disponíveis não apresentam suficiente eficácia, em resultado da fraca permeação na unha, estando dependentes da remoção mecânica da porção afetada (ROSEN *et al.*, 2015). A estrutura densamente queratinizada que compõe a placa ungueal atua como uma barreira à difusão tópica de fármacos, e conseqüentemente a concentração de fármaco dificilmente atinge o nível terapêuticamente eficaz na lâmina ungueal ventral e leito ungueal (AKHTAR *et al.*, 2008).

### **3.4 Cloridrato de terbinafina**

O estudo antifúngicos azóis, como cetoconazol, itraconazol e fluconazol, ofereceram consideráveis avanços para o tratamento de micoses (VERA, 2006), porém a emergência de cepas de fungos potencialmente resistentes tornou necessária a pesquisa de alternativas terapêuticas e novos sítios de ação (SOARES, 2001).

Entre as fármacos com mecanismo de ação diferente dos azóis encontra-se o cloridrato de terbinafina (TBF), pertencente à classe das alilaminas, com atuação sobre a enzima epoxidase da célula fúngica, especialmente indicada para infecções cutâneas produzidas por fungos do grupo dos dermatófitos. Ao contrário dos imidazólicos, o TBF tem ação fungicida. O TBF é mais seletivo para a célula fúngica do que a anfotericina B, antifúngico considerado padrão, devido à diferença das enzimas epoxidases dos mamíferos e dos fungos (GUPTA *et al.*, 2003).

O TBF possibilita administração conjunta com outras drogas e seus efeitos colaterais ou tóxicos são considerados leves (JAIN, 2000). O fármaco apresenta

natureza lipofílica (quando na forma de terbinafina base), o que leva ao seu acúmulo no tecido adiposo e queratinoso. Devido a essas características é considerado o antifúngico de eleição para o tratamento das dermatofitoses e onicomicoses (HAY, 1999). O TBF é o fármaco mais importante da classe das alilaminas, que tem tanto propriedade fungistática quanto fungicida (NOVERR, 2001).

Por tratar-se de um fármaco lipofílico, o TBF concentra-se rapidamente no estrato córneo, primeiramente por difusão do sistema vascular, com aumento da concentração no sebo, cabelo e unha (LEYDEN, 1998). A TBF é metabolizada no fígado independente da via P450, originando metabólitos tais como carboxiterbinafina, hidroxiterbinafina, desmetil e n-desmetilterbinafina (LEYDEN, 1998).

### **3.5 Óleos essenciais: Aspectos importantes e características gerais**

Os óleos essenciais são metabólitos secundários extraídos de diversas partes de plantas. Eles possuem composição química complexa e garantem aos vegetais vantagens adaptativas no meio em que estão inseridos. Esses óleos são compostos voláteis, extraídos de plantas por diversos processos, onde o mais utilizado é a destilação por arraste de vapor d'água. Os óleos essenciais podem ser usados como importantes princípios ativos em produtos destinados à terapêutica, por possuírem uma variedade de efeitos farmacológicos (MIRANDA *et al.*, 2016; VIEIRA *et al.*, 2018). São compostos principalmente de mono e sesquiterpenos e de fenilpropanoides, metabólitos que conferem suas características organolépticas (BIZZO *et al.*, 2009).

O aumento da atividade biológica dos óleos essenciais tem se mostrado dependente da composição de seus constituintes químicos. Estes constituintes são responsáveis pelas propriedades antissépticas, antibacterianas, antifúngicas e

antiparasíticas (LIMA *et al.*, 2006).

Utilizam-se diferentes métodos de extração para isolar tais óleos, devendo-se ressaltar que, dependendo do método, a composição do óleo pode variar significativamente (CASSEL *et al.*, 2009). Alguns dos métodos de extração mais utilizados são: hidrodestilação, extração por solventes orgânicos, destilação a vapor, extração por fluido supercrítico, enfloração, prensagem a frio, dentre outros. A proporção de óleos essenciais extraídos por destilação a vapor é de 93%, enquanto que os 7% restantes são extraídos utilizando os outros métodos (YUSOFF *et al.*, 2011). Além disso, a análise da composição química destes óleos é realizada através de cromatografia gasosa, a fim de identificar os óleos, seus componentes e realizar a definição de sua pureza (PADOVAN *et al.*, 2017).

### **3.5.1 Óleo essencial de Melaleuca**

O gênero *Melaleuca*, pertencente à família Myrtaceae, inclui aproximadamente 100 espécies nativas da Austrália e Ilhas do Oceano Índico. *Melaleuca alternifolia* é comumente conhecida na Austrália como "árvore de chá", florescendo principalmente em áreas de pântano, próximas de rios. O principal produto é o óleo essencial (TTO - tea tree oil), de grande importância medicinal por possuir comprovada ação bactericida e antifúngica contra diversos patógenos humanos, sendo utilizado em formulações tópicas. É extraído da planta por hidrodestilação ou destilação por arraste a vapor (GUSTAFSON *et al.*, 1998; CARSON *et al.*, 2006).

A composição do óleo é regulada pelo padrão ISO 4730, no que se refere às concentrações de cada um dos seus componentes. Esse óleo essencial tem como principal constituinte o terpinen-4-ol, seguido de gama-terpieno e alfa terpieno aos quais se atribui o amplo espectro de atividade biológica, bem como, a atividade

antimicrobiana (FLORES *et al.*, 2011 CASARIN *et al.*, 2017).

Mais especificamente, dentre os cerca de 100 componentes, sendo alguns utilizados como marcadores para controle de qualidade e relatados no laudo de análise emitido por fornecedores, o terpinen-4-ol é o componente majoritário ( $\geq 30\%$ ) e que possui maior atividade antimicrobiana, induzindo perda de membrana e interferindo na integridade e fisiologia bacteriana. Outros componentes como o 1,8 cineol, que é considerado irritante à pele, aumenta a permeabilidade da membrana, facilitando a entrada de outros agentes antimicrobianos, sendo descrito como detentor de efeito antimicrobiano (OLIVEIRA, 2011).

Entretanto, faz-se necessário ressaltar que o TTO na sua forma pura apresenta relativa fototoxicidade e potencial alergênico no que se refere ao uso tópico, também podendo haver oxidação dos constituintes durante o armazenamento (FLORES *et al.*, 2013; CARSON *et al.*, 2006).

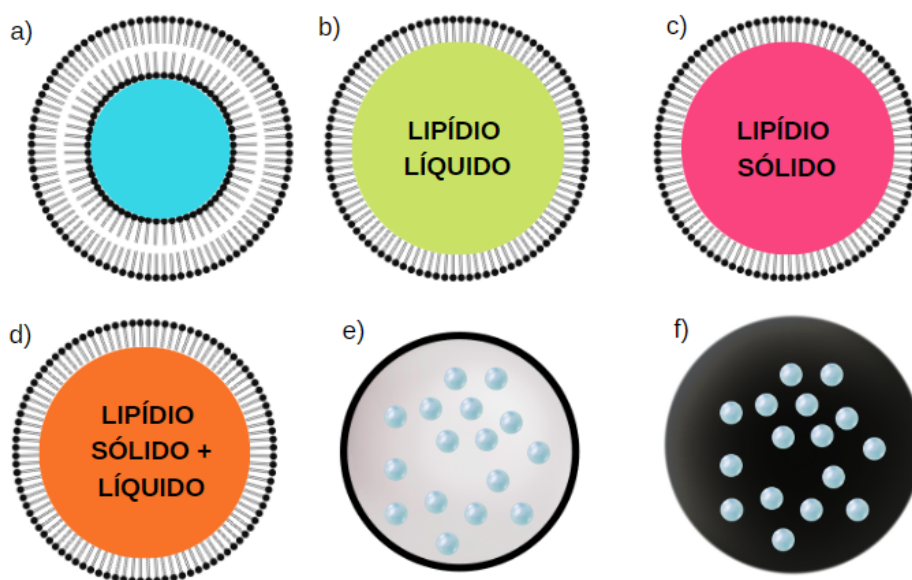
### **3.6 Nanopartículas**

A nanotecnologia consiste no desenvolvimento, caracterização e aplicação de materiais em escala nanométrica (MIHRANYAN *et al.*, 2012; MORITZ *et al.*, 2013). Até o presente momento, pesquisadores da área de química reconhecem diversos nanossistemas que se diferenciam de acordo com sua composição.

Dentre os sistemas nanométricos, destacam-se os lipossomas, as NE e as nanopartículas. Os lipossomas (Figura 2a) têm estruturas de membranas em bicamada lipídica compostas de fosfolípidios. As NE (Figura 2b) são dispersões compostas por dois líquidos imiscíveis, como óleo e água (O/A). As nanopartículas podem ser subdivididas em nanopartículas lipídicas sólidas (Figura 2c), semelhantes às NE (O/A), mas o óleo é substituído por um lipídio sólido e;

carreadores lipídicos nanoestruturados (Figura 2d), os quais são produzidos a partir da mistura entre lipídios sólidos e lipídios líquidos; nanocápsulas (Figura 2e), nas quais o polimérico está disposto ao redor de um núcleo oleoso; e nanoesferas (Figura 2f), formadas por uma matriz polimérica (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; SILVA, 2004; MÜLLER, 2007; KHAN *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2014).

Figura 2 - Figura esquemático dos sistemas nanoestruturados: (a) lipossoma; (b) nanoemulsão; nanopartícula lipídica sólida; (d) carreador lipídico nanoestruturado; (e) nanocápsula e; (f) nanoesfera.



Fonte: a autora

### 3.7 Nanoemulsões

A determinação do diâmetro de gotícula e da sua distribuição é uma análise fundamental nas nanoemulsões independente do uso destinado. Apesar da instabilidade termodinâmica, as nanoemulsões são sistemas cineticamente estáveis e apresentam diversas potencialidades como sistemas carreadores de fármacos (BRUXEL *et al.*, 2012).



A maturação de Ostwald, também conhecida como envelhecimento de Ostwald, é o mecanismo principal para a desestabilização de NE, o qual surge da polidispersão de uma emulsão e da diferença de solubilidade e/ou dos potenciais químicos entre as partículas pequenas e grandes (KOUENIATIS *et al.*, 2010).

Diversos componentes (óleos, tensoativos e adjuvantes) e vários métodos de preparo são empregados no desenvolvimento de NE. Os métodos podem ser divididos basicamente em métodos de alta e baixa energia. Os métodos que empregam alta energia incluem a microfluidização, homogeneização à alta pressão e sonicação (TADROS *et al.*, 2004).

Outros métodos não fazem o uso da energia externa promovida pelos métodos físicos, sendo denominados de métodos de emulsificação de baixa-energia, pois fazem uso da energia química armazenada nos componentes (SOLANS *et al.*, 2005). Dentro desta classe estão incluídos métodos como a emulsificação espontânea (BOUCHEMAL *et al.*, 2004), que se baseia na dispersão de uma solução solvente-óleo na fase aquosa, com subsequente evaporação do solvente e redução do volume sob pressão reduzida.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 Preparo das nanoemulsões**

As preparações de NE foram realizadas através do método de emulsificação espontânea (BOUCHEMAL *et al.*, 2004). A metodologia para se obter nanoemulsões por emulsificação apresentou os seguintes passos: primeiramente, preparou-se triplicatas de soluções orgânicas composta por diferentes concentrações de TTO, e concentrações fixas de TBF, etanol, acetona e tensoativo de baixo EHL Span®60 (Tabela 1), aquecida em banho-maria (40 °C) até a completa dissolução dos constituintes.

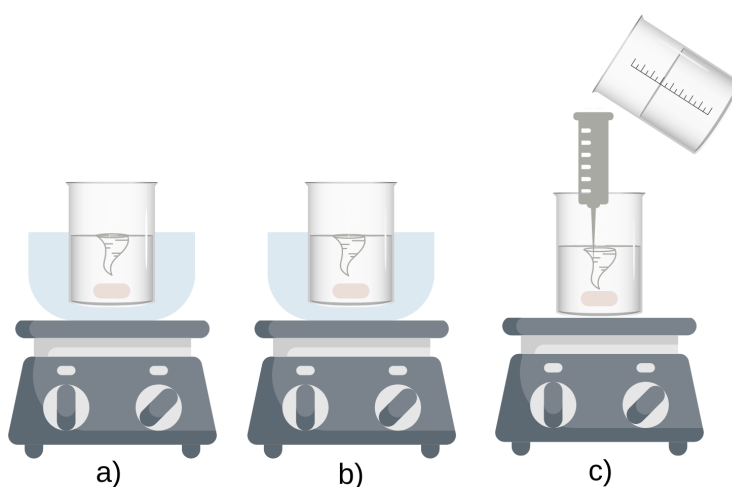
Tabela 1 - Composição quali-quantitativa das nanoemulsões contendo cloridrato de terbinafina associados ou não com óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*.

	NE1	NE2	NE3	NB 1
<b>FASE ORGÂNICA</b>				
Span 60	0,077g	0,077g	0,077g	0,007g
Óleo de Melaleuca	0,16g	0,24g	0,32g	0,16g
Acetona	23mL	23ml	23ml	23mL
Etanol	4mL	4mL	4mL	4mL
Cloridrato de Terbinafina	0,005g	0,005g	0,005g	-
<b>FASE AGUOSA</b>				
Tween 80	0,077g	0,077g	0,077g	0,077g
Água Ultra Purificada	53mL	53ml	53ml	53ml

Fonte: a autora

Após preparada, a fase oleosa foi vertida lentamente e sob agitação moderada através de barras magnéticas de um funil estreito sob a fase aquosa composta de uma solução de tensoativo de alto EHL (Tween 80®) em água ultrapura - MilliQ® (Figura 3). Após a formação das NE, a solução foi mantida sob agitação moderada durante 20 minutos.

Figura 3 - Esquema representativo do processo de preparação das NE pelo método de emulsificação espontânea (a) Preparação da fase orgânica sob agitação . (b) Preparação da fase aquosa em agitação. (c) Fase orgânica sendo dispersa na fase aquosa.



Fonte: a autora

Em seguida, a suspensão foi concentrada em evaporador rotatório para eliminação do solvente orgânico e parte da água até obtenção de 10 mL de NE. Como controle, foi preparada, de modo semelhante, NE contendo TTO mas sem o fármaco TBF, sendo denominada NB1. As formulações foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar, protegidos da luz, em temperatura ambiente.

## **4.2 Caracterização físico-química de nanoemulsões contendo óleo de *Melaleuca alternifolia* e cloridrato de terbinafina**

### **4.2.1 Determinação da distribuição e do tamanho das partículas**

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 valor  $D_{[4,3]}$  que representa o diâmetro médio baseado no volume da partícula.

Os dados de difração de laser obtidos foram avaliados utilizando o valor  $d_{4,3}$ , que representa o diâmetro médio baseado no volume da partícula e, ainda, os valores de 10, 50 e 90% da distribuição ( $d_{10\%}$ ,  $d_{50\%}$  e  $d_{90\%}$ , respectivamente) que indicam a percentagem de partículas possuindo diâmetro igual ou inferior ao valor determinado. O valor do *Span* (Equação 1), que é um indicativo da polidispersão do sistema, também foi utilizado para a caracterização das formulações.

$$span = \frac{d_{90} - d_{10}}{d_{50}} \quad (01)$$

Onde,  $d_{10}$ ,  $d_{50}$  e  $d_{90}$  são os diâmetros representativos de 10%, 50% e 90% da distribuição, respectivamente, e correspondem ao volume total da NE com diâmetro menor ou igual a estes valores..

#### **4.2.2 Determinação de pH**

O pH das NE foram determinados com potenciômetro (Hanna®) calibrado com soluções tampões de pH 4,0 e pH 7,0 diretamente nas formulações de NE.

#### **4.3 Determinação do teor de TBF nas NE**

A determinação da concentração total de TBF associado às nanoemulsões foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, cromatógrafo Proeminence®, Shimadzu), a 224 nm, utilizando metodologia previamente validada. Para a determinação da concentração total de TBF (ConcTotal) na suspensão de NE, 100 µL da formulação foram adicionados a 10 mL (q.s.p) de metanol, até a completa dissolução. O sistema foi mantido em banho de ultrassom por 30 minutos e uma alíquota desta solução foi avaliada por CLAE. O teor de TBF presente nas suspensões de NE foi expresso em mg/mL. Os experimentos foram realizados em duplicatas.

#### **4.4 Determinação da EE do fármaco**

O TBF foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, cromatógrafo Proeminence®, Shimadzu), baseando-se em estudos da literatura (SEPAROVIC e LOURENÇO, 2022). Utilizou-se como fase estacionária uma coluna LC-18 (150mm x 4,6 mm, 5 µm). Como fase móvel foi utilizada acetonitrila e metanol, na proporção 50:50 (v:v). Foram utilizados comprimento de onda de 224nm, volume de injeção de 10 µL e fluxo de 0,4 mL/min. Os dados foram

processados usando o software Shimadzu LC Solutions.

A determinação da concentração de ativo associado às nanoemulsões (eficiência de encapsulação - EE) foi realizada pelo método de ultrafiltração/centrifugação, onde 300 µL da nanoemulsão foi transferido para unidades de centrifugação Amicon Ultra-0,5 (Ultracel® - 100 K 100.000 MW; Millipore, Corp., EUA), seguido de centrifugação (5.000 rpm, 10 min) para separar o ativo livre do TBF nanoencapsulado. O ultrafiltrado foi coletado e avaliado por CLAE. A EE do TBF foi calculada a partir da diferença entre a concentração total de TBF (Conc<sub>Total</sub>) encontrada nas suspensões de NE, após sua completa dissolução em metanol, e a concentração de ativo livre presente no ultrafiltrado (Conc<sub>Ultrafiltrado</sub>). A EE foi calculada conforme Tagliari et al., (2012) (Equação 2):

$$EE (\%) = \left( \frac{Conc_{Total} - Conc_{Ultrafiltrado}}{Conc_{Total}} \right) \times 100 \quad (02)$$

Onde:

Conc<sub>Total</sub> = concentração total de ativo encontrada na nanoemulsão após dissolução das nanopartículas;

Conc<sub>Ultrafiltrado</sub> = concentração de ativo livre encontrada no ultrafiltrado.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Preparo das nanoemulsões

Com a finalidade de avaliar a influência do fármaco sobre as características físico-químicas das nanoemulsões e otimizar as condições de preparação, formulações com diferentes concentrações de TTO foram preparadas pela técnica de emulsificação espontânea (BOUCHEMAL et al., 2004). As formulações NE1,

NE2 e NE3 desenvolvidas apresentaram coloração branca leitosa (Figura 4), odor característico do TTO e aspecto homogêneo sob análise visual.

Figura 4 - Características da NE



Fonte: a autora

## **5.2 Caracterização físico-química de nanoemulsões contendo óleo de *Melaleuca alternifolia* e cloridrato de terbinafina**

### **5.2.1 Determinação da distribuição do tamanho das partículas**

A hipótese fundamental na difração do laser é o padrão de espalhamento de luz formado no detector que é um somatório de padrões de espalhamento produzido por cada partícula que está sendo amostrada (KIPPAX, 2005).

A literatura destaca que o diâmetro é influenciado pela composição qualitativa e quantitativa das formulações e pelo método de preparo utilizado. Um aumento de 10% na concentração de óleo pode aumentar o diâmetro significativamente. A composição da interface, bem como a quantidade de tensoativos e cotensoativos, também têm demonstrado influenciar esta característica (BRUXEL *et al.*, 2012).

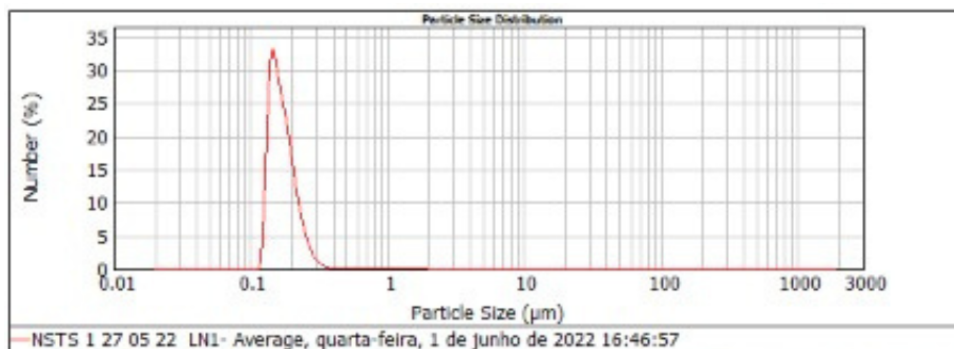
Neste trabalho, a análise por difratometria de laser mostrou que o tamanho de partícula das nanoemulsões desenvolvidas variou de 371 a 449 nm, span 0,556 a 0,576 (Tabela 2) respectivamente e perfil de distribuição granulométrica (Figura 5,6 e 7).

Tabela 2 - Difratometria de laser e Span

	<b>NE1</b>	<b>NE2</b>	<b>NE3</b>
<b>D[4,3]</b>	371nm	382nm	395nm
<b>Span</b>	0,556	0,573	0,576

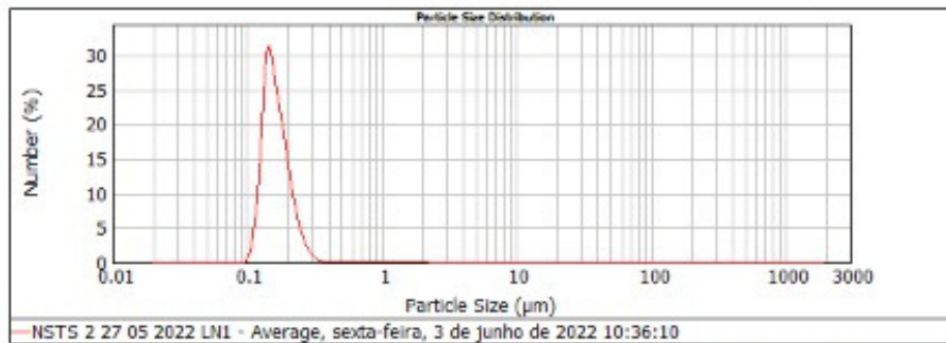
Fonte: a autora

Figura 5 - Perfil de distribuição granulométrica da NE1



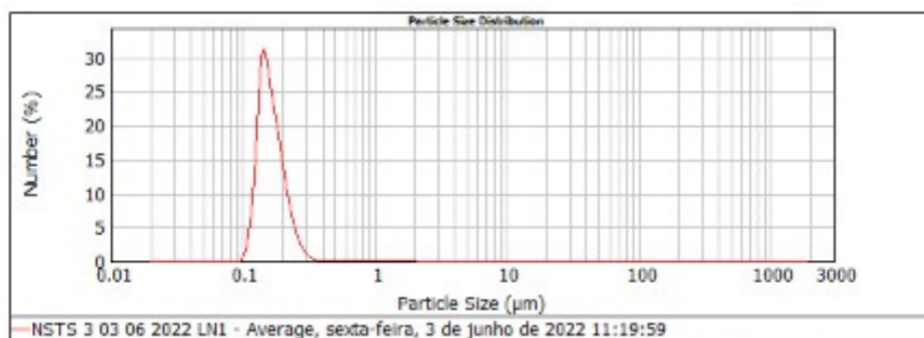
Fonte: Software mastersizer

Figura 6 - Perfil de distribuição granulométrica da NE2



Fonte: Software mastersizer

Figura 7 - Perfil de distribuição granulométrica da NE3



Fonte: Software mastersizer

O tamanho das partículas mostrou-se dependente da concentração de TTO adicionada ao sistema, detectando-se aumento significativo no tamanho das gotículas das nanoemulsões contendo igual quantidade de tensoativo. As formulações com os maiores tamanhos de partícula foram desenvolvidas com as maiores concentrações de TTO. Esses valores confirmam a hipótese de que a concentração de óleo e/ou ativo de consistência oleosa utilizada na formulação é fator determinante no diâmetro de partícula (SCHAFFAZICK et al., 2003).

De modo semelhante, Hosseini e colaboradores (2013), observaram que o tamanho médio das nanopartículas de quitosana e trifosfato de sódio contendo



carvacrol aumentou proporcionalmente à quantidade de ativo adicionada ao sistema, ainda que todas as formulações tenham apresentado tamanhos de partícula em escala nanométrica.

### 5.2.2 Determinação de pH

A determinação do pH de uma nanoemulsão pode ser indicativo de sua estabilidade e aplicabilidade para via tópica. O valor de pH fornece informações sobre a estabilidade do sistema, pois sua redução pode indicar a presença de ácidos graxos livres na formulação, provenientes da hidrólise do sistema tensoativo (fosfolípidos) (KLANG *et al.*, 1998). O pH está diretamente relacionado com as condições de armazenamento e processamento das formulações.

Os valores de pH encontrados nas NE em estudo estão descritos nas tabelas 3. Todas as preparações apresentaram valores de pH próximos 3,8, sendo classificados como ácidos; contudo, em decorrência da resistência própria da lâmina ungueal, esse valor de pH não promove danos para as unhas, nem para as mãos, já que, a camada córnea da pele apresenta pH de 4 a 5,5 (ROCHA, 2007). Desse modo, as NE com TBF apresentaram pH próximo ao fisiológico para a área - a que se destinam. A formulação NB1, por sua vez, apresentou pH ligeiramente mais alta, mostrando que a presença do fármaco interfere no valor de pH da formulação.

Tabela 3 - Valores de pH de diferentes lotes de NE contendo TTO em diferentes concentrações e cloridrato de terbinafina

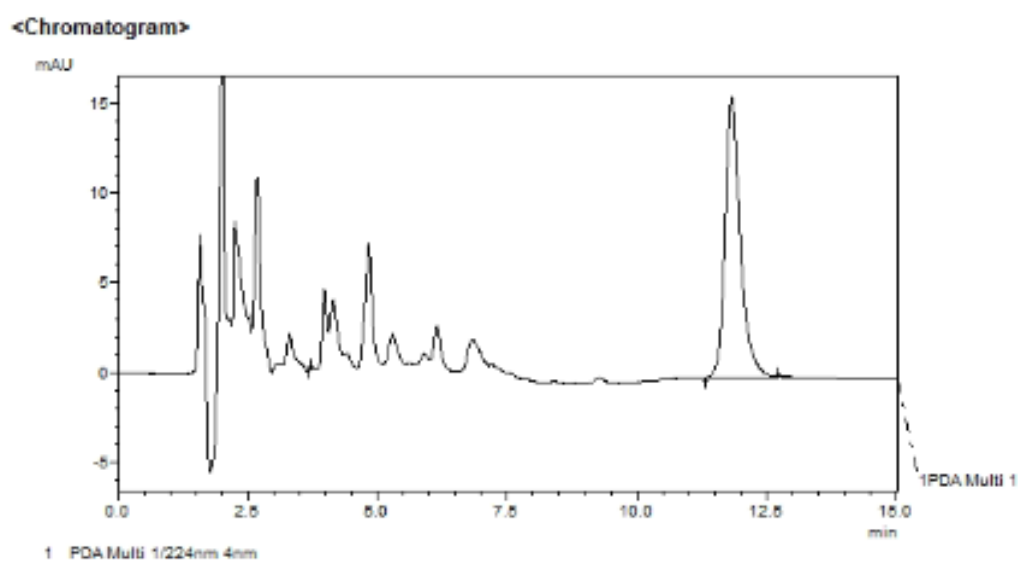
	NE1		NE2		NE3	
	1NE1	2NE1	1NE2	2NE2	1NE3	2NE3
pH	3,82	3,82	3,82	3,81	3,95	3,70
Média	3,82		3,82		3,83	

Fonte: a autora

### 5.3 Determinação do teor de TBF nas NE

O método desenvolvido para quantificação do TBF por CLAE apresentou tempo de análise de 15 minutos, com tempo de eluição do TBF em 12 minutos, conforme demonstrado na Figura 8 .

Figura 8 - Perfil cromatográfico do TBF em solução de metanol (10 µg/mL) utilizando uma coluna LC-18 (150mm x 4,6 mm, 5 µm). Fase móvel constituída por metanol e acetonitrila, na proporção 50:50 (v/v). Comprimento de onda: 224 nm. Fluxo 0,4 mL/min.



Os resultados obtidos na quantificação do ativo TBF presente nas formulações estão resumidos na Tabela 4.

Tabela 4 - Doseamento cloridrato de terbinafina em diferentes lotes de NE contendo TTO em diferentes concentrações .

	Doseamento					
	NE1		NE2		NE3	
	1NE1	2NE1	1NE2	2NE2	1NE3	2NE3
<b>Teor%</b>	101,71	47,62	47,62	48,71	41,49	43,09
<b>Média</b>	74,66		48,16		42,29	
<b>DP</b>	38,25		0,77		1,14	

Fonte: a autora

Os valores apresentados na tabela 4 demonstram que a concentração real de TBF encontrada nas formulações foi diferente da concentração teórica planejada, podendo ter ocorrido perda do fármaco durante o processo de preparação. Neste caso, a hidrofobicidade do TBF e lipofobicidade do TTO é uma questão a ser considerada.

#### 5.4 Determinação de EE do fármaco

Já os percentuais encapsulados encontrados no ultrafiltrado através do procedimento de ultrafiltração/centrifugação e expressos na tabela 5, indicam que apenas uma quantidade muito baixa não foi encapsulada. Assim, a EE foi alta e não variável com a concentração de TTO utilizada. Considerando este resultado e a baixa lipofobicidade do TBF, isto pode ser um indicativo de que o fármaco não esteja solubilizado no núcleo oleoso, mas aprisionado pelo sistema tensoativo junto às nanoestruturas.

Tabela 5 - Valores de eficiência de encapsulação

	Taxa de encapsulação					
	NE1		NE2		NE3	
	NE1 30	NE 1000	NE2 30	NE2 1000	NE3 30	NE3 1000
<b>Taxa de encapsulação %</b>	99,60	89,94	99,75	92,24	99,72	95,23
<b>Média</b>	94,77		95,99		97,48	
<b>DP</b>	46,73		28,19		10,06	

Fonte: a autora

## 6. CONCLUSÕES

NE de TBF foram preparadas com diferentes concentrações de TTO. Dentre as formulações desenvolvidas, aquela contendo a menor concentração apresentou o menor tamanho. Os valores obtidos pelo doseamento, indicam que pode ter havido perda do TBF durante o preparo das NE. A TBF foi incorporada com alta eficiência de encapsulação.

Este trabalho mostrou a viabilidade da preparação de NE contendo TBF e TTO. Adicionalmente, ensaios complementares de caracterização físico química, como avaliação do perfil de liberação, além da avaliação da atividade antifúngica e avaliação da permeação *in vitro*, podem ser realizados. Assim, estes sistemas carreadores poderão representar, futuramente, uma alternativa à utilização sistêmica de TBF destinada para infecções fúngicas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTI I, KALIA YN, NAIK A, GUY RH. Assessment and Prediction of the Cutaneous Bioavailability of Topical Terbinafine, *In Vivo*, in *Man. Pharmaceutical Research*, 18 (10): 1472-1475, 2001.

SEPAROVIC, Luciana; LOURENÇO, Felipe Rebello. Avaliação da incerteza de medição de um procedimento analítico para determinação de cloridrato de terbinafina em cremes por HPLC e estratégias de otimização usando Analytical Quality by Design. *Microchemical Journal* , v. 178, p. 107386, 2022.

AMARAL, F. Técnicas de Aplicações de óleos essenciais: Terapias de saúde e beleza. Cengage Learning Brasil, 2015. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788522122738/>. Acesso em: 01 Jul 2022

AKHTAR N, SHARMA H, PATHAK K. Onychomycosis: potential of nail lacquers in transungual delivery of antifungals. *Scientifica*. 2016: 1–12.

BAKKALI, F.; AVERBECK S. ; AVERBECK D.; IDAOMAR, M.. Biological effects of essential oils: a review. *Food and Chemical Toxicology*, v.46, n. 2, p. 446-75, Feb 2008.

BARANAUSKAITE, J. et al. The influence of different oregano species on the antioxidant activity determined using HPLC postcolumn DPPH method and anticancer activity of carvacrol and rosmarinic acid. *BioMed Research International*, 2017.

BIZZO, HUMBERTO R., HOVELL, ANA MARIA C. E REZENDE, CLAUDIA M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Química Nova* [online]. 2009, v. 32, n. 3 [Acessado 3 Julho 2022] , pp. 588-594.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000300005>>. Epub 22 Maio 2009. ISSN 1678-7064. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000300005>.

BOUWMEESTER, H.; DEKKERS, S.; NOORDAM, M. Y.; HAGENS, W. I.; BULDER, A. S.; HEER, C.; VOORDE, S. E. C. G.; WIJNHOVEN, S. W. P.; MARVIN, H. J. P.; SIPS, A. J. A. M. Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 53, 52–62, 2009.

BOUCHEMAL, K., S. BRIANÇON, E. PERRIER & H. FESSI (2004) *Int. J. Pharm.* 280: 241-51.

BRUXEL, FERNANDA *et al.* **Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos**. *Química Nova* [online]. 2012, v. 35, n. 9 [Acessado 4 Agosto 2022] , pp. 1827-1840. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000900023>>. Epub 05 Out 2012. ISSN 1678-7064. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000900023>.

BRUXEL, FERNANDA *et al.* **Nanoemulsions as parenteral drug delivery systems**. *Química Nova* [online]. 2012, v. 35, n. 9 [Accessed 28 July 2022] , pp. 1827-1840. Available from: <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000900023>>. Epub 05 Oct 2012. ISSN 1678-7064. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000900023>.

CARSON, C.F.; HAMMER, K.A.; RILEY, T.V. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clinical Microbiology Reviews**, v.19, n.1, p.50-62, 2006.

CASARIN, M., PAZINATTO, J., SANTOS, R. C. V., & ZANATTA, F. B. *Melaleuca alternifolia* and its application against dental plaque and periodontal diseases: A systematic review. **Phytotherapy Research**, 32(2), 230-242, 2018.

CASHMAN, M. W.; SLOAN, S. B. Nutrition and nail disease. *Clinics in Dermatology*, v. 28, p. 420-425, 2010.

CASSEL, E.; VARGAS, R. M. F., MARTINEZ, N.; LORENZO, D.; DELLACASSA, E. Steam distillation modeling for essential oil extraction process. *Industrial Crops and Products*, v. 29, p. 171-176, 2009.

CONSTANTINIDES, P. P.; CHAUBAL, M. V.; SHORR, R.; *Adv. Drug Delivery Rev.* 60, 757, 2008.

CONSTANTINIDES, P. P.; TUSTIAN, A.; KESSLER, D. R.; *Adv. Drug Delivery Rev.* 2004,56,1243.

DRISCOLL, D. F.; *Pharm. Res.* 2006,23,1959.

DARKES M. J, SCOTT, L. J, GOA, K. L. Terbinafine: a review of its use in onychomycosis in adults. *Am. J. Clin. Dermatol.*, v. 4, n. 1, p. 39-65, 2003.

ELKEEB, R. et al. Transungual drug delivery: Current status. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 384, p. 1-8, 2010.

FLECKMAN, P.; ALLAN, C. Surgical anatomy of the nail unit. *Dermatologic Surgery*, v. 27, p. 257-260, 2001

FLORES, F. C., DE LIMA, J. A., RIBEIRO, R. F., ALVES, S. H., ROLIM, C. M. B., BECK, R. C. R., & DA SILVA, C. B. Antifungal activity of nanocapsule suspensions containing tea tree oil on the growth of *Trichophyton rubrum*. *Mycopathologia*, 175(3-4), 281-286, 2013. .

GALINDO-PÉREZ, M. J. et al. **Optimization of the emulsificationdiffusion**

**method using ultrasound to prepare nanocapsules of different food-core oils.**

LWT - Food Science and Technology, n. 87, p. 333- 341, 2018.

GUPTA AK, KOHLI Y. In vitro susceptibility testing of ciclopirox, terbinafine, ketoconazole and itraconazole against dermatophytes and nondermatophytes, and in vitro evaluation of combination antifungal activity. **Br Assoc Dermatol.** 149:296-305, 2003.

GUSTAFSON, J.E. et al. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli* **Letters in Applied Microbiology**, v.26, p.194-8, 1998.

HAY, R. J. Therapeutic potential of terbinafine in subcutaneous and systemic mycoses. *Br. J. Dermatol.*, v. 141, p. 36-40, 1999.

HAY, R. J; ASHBEE, H. R. Mycology. In: BURNS, T.; BREATHNACH, S.; COX, N.; GRIFFITHS, C. Rook's textbook of dermatology. 8ª Edição. Reino Unido: Wiley-Blackwell, v. 1, chapter 3: 3.14, 2010.

HILAL-DANDAN, R.; BRUNTON, L. **Manual de Farmacologia e Terapêutica de Goodman & Gilman.** [Digite o Local da Editora]: Grupo A, 2015. 9788580555066. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788580555066/>. Acesso em: 01 Jul 2022

HELGASON, T.; AWAD, T. S.; KRISTBERGSSON, K.; MCCLEMENTS, D. J.; WEISS, J. Effect of surfactant surface coverage on formation of solid lipid nanoparticles (SLN). **Journal of Colloid and Interface Science**, Oxford, v. 334, n. 1, p. 75-81, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2009.03.012>

JAIN S, SEHGAL VN. Terbinafine, a unique oral antifungal: current perceptions. *Int J Dermatol.* 39:412-23, 2000.



JESSUP, C. J.; RYDER, N. S.; GHANNOUM, M. A. An evaluation of the in vitro of terbinafine. *Med. Micol.*, v.38, n.2, p. 155-159, 2000. ***Journal of the American Academy of Dermatology***, v. 38, n. 5 Part 3, p. S42–7.

KIPPAX, P.; “**Measuring Particle Size Using Modern Laser Diffraction Techniques**”. **Artigo da Revista Paint & Coatings Industry**. 2005. Disponível em: [http://www.malvern.com/malvern/kbase.nsf/allbyno/KB000930/\\$file/MRK696-01.pdf](http://www.malvern.com/malvern/kbase.nsf/allbyno/KB000930/$file/MRK696-01.pdf). Acesso em: 27 de março de 2022.

KHAN, AW et al. Potentials and challenges in self nanoemulsifying drug delivery systems. In: **Expert Opin Drug Deliv.**, n. 9, 2012. p. 1305–17.

KHATIBI, S. A. et al. Effect of Preparation Methods on the Properties of Zataria multiflora Boiss. Essential Oil Loaded Nanoliposomes: Characterization of Size, Encapsulation Efficiency and Stability. *Pharmaceutical Sciences*, v. 20, p. 141-148, 2015.

KLANG, S. H.; PARNAS, M.; BENITA, S. Em Emulsions as drug carriers - possibilities, limitations and future perspectives; Müller, R. H.; Benita, S.; Böhm, B. H. L., eds.; Medpharm GmbH Scientific Publishers: Stuttgart, 1998

KLANG, S.; BENITA, S. Em Design and evaluation of submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration; Benita, S., ed.; Overseas Publishers Association: Amsterdam, 1998.

KOURNIATIS, LORETTA R. et al. Nanoemulsões óleo de laranja/água preparadas em homogeneizador de alta pressão. *Química Nova* [online]. 2010, v. 33, n. 2 [Acessado 4 Julho 2022] , pp. 295-300. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000200013>>. Epub 12 Mar 2010. ISSN 1678-7064. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000200013>.

LEYDEN, J. Pharmacokinetics and pharmacology of Terbinafine and Itraconazole.

LIMA, K. M. L., DELGADO, M. D., DE MELO REGO, R. S., & DE CASTRO, C. M. M. B. Candida albicans e Candida tropicalis isoladas de onicomicose em paciente HIV-positivo: co-resistência in vitro aos azólicos. *Revista de Patologia Tropical*, 37(1), 57-64, 2008.

DE LIMA, A. F., CRUZ, T. P., FERREIRA, M. M., COSTA, A. V., DE JESUS JUNIOR, W. C., MORAES, W. B., DE QUEIROZ, V. T., & ALVES, F. R. (2017). Avaliação do efeito fungicida de óleos essenciais sobre a produção de esporos e fungo *Fusarium solani*. *Revista Univap*, 22(40), 802. <https://doi.org/10.18066/revistaunivap.v22i40.1619>

MAHFOUZ, Ana Paula Zanetti Feuser Perfil etiológico dos agentes fúngicos em pacientes acometidos por onimicoses procedentes dos hospitais universitários de Cuiabá- MT, 2007 – 2011/ Ana Paula Zanetti Feuser, Mahfouz, 2012 76 f.:30cm.

MASON, T. G.; WILKING, J. N.; MELESON, K.; CHANG, C. B.; GRAVES, S. M.; J. **Phys: Condens. Matter** 18, R635, 2006.

MCGRATH, J.A.; UITTO, J. Anatomy and organization of human skin. In: BURNS, T.; BREATHNACH, S.; COX, N.; GRIFFITHS, C. Rook's textbook of dermatology. 8ª Edição. Reino Unido: Wiley-Blackwell, v. 1, chapter 3: 3.14, 2010.

MEZZARI, A.; FUENTEFRÍA, A.M. **Micologia no Laboratório Clínico**. Editora Manole, 2012. 9788520451762. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788520451762/>. Acesso em: 04 Jul 2022

MIHRANYAN, A; FERRAZ, N; STRØMME, M. Current status and future prospects of nanotechnology in cosmetics. In: Progress in Materials Science, n. 57, 2012. p.

875–910.

MIRANDA, Cintia Alvarenga Santos Fraga; CARDOSO, Maria das Graças; BATISTA, Luis Roberto; RODRIGUES, Leonardo Milani Avelar; FIGUEIREDO, Ana Cristina da Silva. **Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas.** Rev. Ciênc. Agron,47(1):213-220. 2016.

MORITZ, M; GESKE-MORITZ, M, The newest achievements in synthesis, immobilization and practical applications of antibacterial nanoparticles. In: Chemical Engineering Journal, n. 228, 2013. p. 596–613.

MÜLLER, RH. **Lipid nanoparticles: recent advances.** In: Adv. Drug Deliv. n. 59, 2007. p. 375–376.

MURDAN, S. Drug delivery to the nail following topical application. International Journal of Pharmaceutics, v. 236, p. 1-26, 2002.

MUKHERJEE, P. K.; ISHAM, N.; GHANNOUM, M. A. Infectious diseases of the skin I: Dermatophytosis/Onychomycosis. In: MURPHY, M. J. Molecular diagnostics in dermatology and dermatopathology. 1ªEdição. Estados Unidos: Humana Press, p. 311-338, 2011.

NAKASHIMA T, SHIMIZU M, KUKIZAKIM. **Membrane emulsification by microporous glass.** Key Eng Mater 61/ 62:513–516, 1991.

NAIR, PK & MOHAN KUMAR, B. & NAIR, VIMALA. (2009). **Agroforestry as a strategy for carbon sequestration.** Journal of Plant Nutrition and Soil Science. 172. 10 - 23. 10.1002/jpln.200800030.

NOVERR, M. C., TOEWS, G. B., HUFFNAGLE, G. B. **Production of**

**Prostaglandins Óleo de *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree): uma revisão de propriedades antimicrobianas e medicinais** CF Carson, KA Hammer, TV Riley  
Clin Microbiol Rev. 2006 Jan; 19(1): 50-62. doi: 10.1128/CMR.19.1.50-62.2006  
PMCID:PMC1360273

OLIVEIRA, A.C.M. et al. Emprego do óleo de *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) na odontologia: perspectivas quanto à utilização como antimicrobiano alternativo às doenças infecciosas de origem bucal. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais [online]. 2011, v. 13, n. 4 [Acessado 4 Julho 2022] , pp. 492-499. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1516-05722011000400015>>. Epub 13 Jan 2012. ISSN 1983-084X. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722011000400015>.

PADOVAN A., KESZEI A., HASSAN Y., KRAUSE ST, KÖLLNER TG, DEGENHARDT J., GERSHENZON J., KÜLHEIM C., FOLEY WJ. Four Terpene Synthases Contribute to the Generation of Chemotypes in Tea Tree ( *Melaleuca alternifolia* ). **BMC Plant Biol**. 2017; 17 :160. doi: 10.1186/s12870-017-1107-2.

PADOVAN, A., KESZEI, A., HASSAN, Y. *ET AL.*, Quatro terpeno sintases contribuem para a geração de quimiotipos em tea tree ( *Melaleuca alternifolia* ). **BMC Plant Biol** 17, 160 (2017). <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1107-2>

PEREZ, A. Terbinafine: broad new spectrum of indications in several subcutaneous and systemic and parasitic diseases. Mycoses, v. 42, p. 111-114, 1999.

POHLMANN, MARIANA; ROSSI, WAGNER SOARES; BRENDLER, CLARIANA FISCHER; TEIXEIRA, FÁBIO GONÇALVES; KINDLEIN JÚNIOR, WILSON; "Fabricação Digital Para Auxiliar No Ensino-Aprendizado De Alunos Com Deficiência Visual: Estudo De Caso Dos Sistemas Nanoestruturados", p. 2389-2396 . In: **Anais do 12º Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em Design [= Blucher Design Proceedings, v. 9, n. 2]**. São Paulo: Blucher, 2016. ISSN 2318-6968, DOI 10.5151/despro-ped2016-0204

POHLMANN, M et al. Drawing, virtual modeling and 3D print in the production of didactic models for the teaching-learning of visually impaired students: case study of nanostructured systems. In: **International Journal of Education and Research**, v. 3, n. 12, 2015. p. 453-466.

ROSEN T, FRIEDLANDER SF, KIRCIK L, ZIRWAS MJ, STEIN GOLD L, BHATIA N, *et al.* Onychomycosis: epidemiology, diagnosis, and treatment in a changing landscape. *J Drugs Dermatol.* 2015;14:223-33.

RYDER, N. S. Activity of terbinafine against serious fungal pathogens. *Mycoses*, v. 42, p. 115-119, 1999.

ROCHA, L.A. Microbiota das mãos de enfermeiras, estudantes universitários e técnicos de laboratório associada à lavagem higiênica. 2007. 64f. Dissertação (Mestrado em imunologia e parasitologia aplicados). Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia/MG, 2007.

RUIZ, L. R. B.; CHIACCHIO, N. D. Manual de conduta nas onicomicosis: Diagnóstico e Tratamento. In: Sociedade Brasileira de Dermatologia. Manual de Conduta. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Dermatologia; p. 191-201, 2004.

SCHAFFAZICK, SR et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. In: *Química Nova*, v. 26, n. 5, 2003. p. 726-737.

SILVA, GA. Introduction to nanotechnology and its applications to medicine. In: **Surgical Neurology**, v.61, 2004. p.216-220.

SYED, I.; SARKAR, P. Ultrasonication-assisted formation and characterization of geraniol and carvacrol-loaded emulsions for enhanced antimicrobial activity against food-borne pathogens. *Chemical Papers*, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11696-018-0501-z>

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; MELLO, J.C.P.D.; AL., E. **Farmacognosia**. [Digite o Local da Editora]: Grupo A, 2017. 9788582713655. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788582713655/>. Acesso em: 01 Jul 2022

SINKO, P J. (Org.). Martin: Físico-farmácia e ciências farmacêuticas. 5. ed. Porto Alegre: **Artmed**, p. 810, 2008.

SOARES MMSR, CURY AE. In Vitro activity of antifungal and antiseptic agents against dermatophyte isolates from patients with tinea pedis. **Brazilian J Microbiol.** 32:130-4, 2001.

SOLANS, C., P. IZQUIERDO, J. NOLLA, N. AZEMAR & M.J. GARCIA-CELMA (2005) Curr. Opin. Colloid Interf. Sci. 10: 102-10.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C.; Adv. **Colloid Interface Sci.** 108-109, 303, 2004.

TAGLIARI, M. P et al. Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação de ácido glicirrízico, ácido salicílico e cafeína em nanopartículas de quitosana e alginato. *Química Nova*, v. 35, n. 6, p. 1228-1232, 2012.

VEJNOVIC, I.; SIMMLER, L.; BETZ, G. Investigation of different formulations for drug delivery through the nail plate. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 386, p. 185-194, 2010.

VERA JRM, CERVERA LA. Ventajas y desventajas de los antifúngicos de uso tópico. [acesso 14 Maio 2006]. Disponível em: [www.seq.es/seq/html/revista\\_seq/0301/rev1](http://www.seq.es/seq/html/revista_seq/0301/rev1).

VIEIRA, Ana Julia; BESERRA, Fernando Pereira; SOUZA, MC; TOTTI, BM;

ROZZA, Ariane. **Limonene: Aroma of innovation in health and disease.** ChemBiolInteract, 283:97- 106, Mar. 2018.

YUSOFF, Z. M.; NORDIN, M. N. N.; RAHIMAN, M. H. F.; ADNAN, R.; TAIB, M. N. Characterization of Down-Flowing Steam Distillation System using Step Test Analysis. IEEE CSGRC, p. 197-201, 2011.

Yu, W., E.S. Tabosa Do Egito, G. Barrat, J.P. Fessi, J.P. Devissaguet & F. Puisieux (1993) Int. **J. Pharm.** 89: 139-46.

WANG, S et al. Application of nanotechnology in improving bioavailability and bioactivity of diet-derived phytochemicals. In: **Journal of Nutritional Biochemistry**, n. 25, 2014. p. 363–376.

ZAIAS, N. Chapter 8: Onychomycosis. In: ZAIAS, N. The Nail in Health and Disease. 1. Ed. Miami Beach: MTP Press Limited, 1980. p. 91-113.

ZHANG, A. Y., CAMP, W. L., ELEWSKI, B. E. Advances in Topical and Systemic Antifungals. **Dermatologyc Clinics**, v. 25, p. 165–183, 2007.