

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Faculdade de Farmácia**

Yamara Viana Sousa

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE  
UMA SUSPENSÃO INJETÁVEL DE ITRACONAZOL PARA TRATAMENTO DA  
ESPOROTRICOSE FELINA**

Belo Horizonte

2022

Yamara Viana Sousa

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE  
UMA SUSPENSÃO INJETÁVEL DE ITRACONAZOL PARA TRATAMENTO DA  
ESPOROTRICOSE FELINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Gisele Assis Castro Goulart.

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Camila Stefanie Fonseca de Oliveira.

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Kelly Moura Keller.

Belo Horizonte

2022

S725d Sousa, Yamara Viana.  
Desenvolvimento, caracterização e avaliação da eficácia de uma suspensão injetável de itraconazol para tratamento da esporotricose felina [recurso eletrônico] / Yamara Viana Sousa. – 2022.  
1 recurso eletrônico (144 f. : il.) : pdf

Orientadora: Gisele Assis Castro Goulart.  
Coorientadoras: Camila Stefanie Fonseca de Oliveira e Kelly Moura Keller.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Esporotricose – Teses. 2. Felidae – Teses. 3. Itraconazol – Teses. 4. Terapêutica – Teses. I. Goulart, Gisele Assis Castro. II. Oliveira, Camila Stefanie Fonseca de. III. Keller, Kelly Moura. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. V. Título.

CDD:615.4



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

### FOLHA DE APROVAÇÃO

**\*DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE UMA SUSPENSÃO INJETÁVEL DE ITRACONAZOL PARA TRATAMENTO DA ESPOROTRICOSE FELINA\***

**YAMARA VIANA SOUSA**

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestra em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

#### Comissão

Profa. Dra. Maria Isabel de Azevedo  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Profa. Dra. Elaine Amaral Leite  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Profa. Dra. Gisele Assis Castro Goulart - Orientadora  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Profa. Dra. Camila Stefanie Fonseca de Oliveira - Coorientadora  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Profa. Dra. Kelly Moura Keller - Coorientadora  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 19 de dezembro de 2022.



Documento assinado eletronicamente por Gisele Assis Castro Goulart, Professora do Magistério Superior, em 19/12/2022, às 12:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Elaine Amaral Leite, Professora do Magistério Superior, em 19/12/2022, às 12:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no



art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Kelly Moura Keller, Professora do Magistério Superior, em 19/12/2022, às 14:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Maria Isabel de Azevedo, Membro, em 19/12/2022, às 15:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Camilla Stefanie Fonseca de Oliveira, Professora do Magistério Superior, em 20/12/2022, às 00:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 1957244 e o código CRC D7CF3777.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por me abençoar das mais variadas formas durante toda a minha vida e pela possibilidade de ter vivido a experiência do mestrado, algo que foi tão singular para mim tanto no âmbito profissional, quanto no âmbito pessoal.

Agradeço também à minha orientadora, professora Gisele Goulart, uma das profissionais mais excepcionais com quem já tive a honra de trabalhar e que sempre me acolheu e me auxiliou com toda a sua sabedoria, empatia e compreensão. Agradeço também às coorientadoras, professoras Camila Oliveira e Kelly Moura, por terem aceito o desafio de conduzir o presente projeto de pesquisa, no qual se destaca também o auxílio dado pela veterinária Bianca Moreira, principalmente na etapa de realização do estudo *in vivo*. Agradeço também à UFMG pela oportunidade de desenvolver o projeto de pesquisa em questão e, ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

À minha mãe Berenice; ao meu pai Uzimar; ao meu irmão Vinícius; à minha sobrinha - a quem considero como filha – Estella; e à minha tia Cida; agradeço por todo o amor, carinho, suporte e ensinamentos que sempre me foram dados: sem vocês, eu jamais teria alcançado essa conquista. Agradeço também ao meu querido Gabriel, com quem compartilhei a minha jornada do mestrado e com quem pretendo compartilhar toda a minha vida. A todos vocês citados neste singelo parágrafo, ofereço além do meu agradecimento, o meu amor incondicional.

Agradeço aos (far)migos Isabella e Felipe (com quem vivenciei grande parte da minha graduação e toda a experiência do mestrado) por terem participado da(s) minha(s) jornada(s) e por terem me permitido participar das jornadas e experiências vividas por vocês. Às “Meninas da Gisele” (com um destaque especial à minha companheira de projeto, Marie); Carol Faria; Carol Dohanik; Cris; Bruna; Letícia; e, já na reta final, às alunas de Iniciação Científica Anna Beatriz e Laura; deixo o meu agradecimento pelo companheirismo e auxílio nessa etapa tão desafiadora da minha vida. E por último, mas tão importante quanto os demais agradecimentos, deixo minhas lágrimas de saudade por meu irmão, Uzimar Júnio. Trago você em meu coração.

## RESUMO

A esporotricose é uma infecção fúngica crônica causada por espécies do gênero *Sporothrix*, sendo *S. brasiliensis* e *S. schenckii* as de maior relevância. A infecção afeta animais e humanos, sendo os felinos os principais reservatórios e fontes de disseminação. A esporotricose foi elencada pela Organização Mundial de Saúde como uma das principais doenças tropicais negligenciadas para o decênio 2021-2030. O itraconazol (ITZ) é o fármaco de primeira escolha e o tratamento, tanto em animais como humanos, é usualmente feito via administração oral de cápsulas. Contudo, em consequência do tratamento prolongado e regular, não raramente, observa-se a suspensão deste, devido a reações adversas, custo e dificuldade de administração oral nos felinos. Assim, visando otimizar o tratamento da esporotricose em felinos, o presente trabalho teve como proposta desenvolver, caracterizar e avaliar a eficácia de uma suspensão injetável de ITZ. Durante este estudo, foi possível obter duas suspensões a base de ITZ, denominadas **GT64** e **GT109**. As formulações foram desenvolvidas após extensa revisão da literatura, seleção dos excipientes mais promissores e avaliação da solubilidade mínima do ITZ. A caracterização das formulações foi realizada por meio das análises macro e microscópicas, perfil reológico, osmolaridade, tamanho das partículas e teor de ITZ por cromatografia líquida de alta eficiência. Também foram avaliados os métodos de esterilização por calor úmido e por radiação gama. Ambas as formulações se apresentaram como uma suspensão turva, facilmente ressuspondível, com comportamento não-Newtoniano pseudoplástico. Na formulação **GT64**, foi possível observar a presença de uma “matriz” polimérica estabilizando os cristais de ITZ ( $D_{90}$ : 39,6  $\mu\text{m}$ ) e a osmolaridade foi de  $0,795 \pm 0,005$  Osm/Kg. Já na formulação **GT109**, não foi possível observar a presença de uma “matriz” polimérica, os cristais de ITZ apresentaram  $D_{90}$  de 51,35  $\mu\text{m}$  e a formulação apresentou  $1,396 \pm 0,009$  Osm/Kg. O método analítico desenvolvido mostrou-se adequado para avaliação do perfil de impurezas e do teor de ITZ. No estudo clínico, somente a formulação **GT64** foi avaliada, por apresentar características mais promissoras. Os resultados obtidos até o momento forneceram evidências do potencial da formulação em contribuir para o tratamento da esporotricose felina.

Palavras-chave: esporotricose; itraconazol; felinos; tratamento.

## ABSTRACT

Sporotrichosis is a chronic fungal infection caused by species of the genus *Sporothrix*, with *S. brasiliensis* and *S. schenckii* being the most relevant. The infection affects animals and humans, with felines being the main reservoirs and sources of dissemination. Sporotrichosis was listed by the World Health Organization as one of the main neglected tropical diseases for the 2021-2030 decade. Itraconazole (ITZ) is the drug of first choice and treatment, both in animals and humans, is usually done via oral administration of capsules. However, as a result of prolonged and regular treatment, the suspension of the treatment is not uncommon, due to adverse reactions, cost and difficulty of oral administration in cats. Thus, aiming to optimize the treatment of sporotrichosis in felines, the present work aimed to develop, characterize and evaluate the effectiveness of an injectable suspension of ITZ. During this study, it was possible to obtain two suspensions based on ITZ, called **GT64** and **GT109**. The formulations were developed after extensive literature review, selection of the most promising excipients and evaluation of the minimum ITZ solubility. The characterization of the formulations was performed through macro and microscopic analyses, rheological profile, osmolarity, particle size and ITZ content by high performance liquid chromatography (HPLC). Moist heat and gamma radiation sterilization methods were also evaluated. Both formulations appeared as a cloudy suspension, easily resuspendable, with non-Newtonian pseudoplastic behavior. In the **GT64** formulation, it was possible to observe the presence of a polymeric "matrix" stabilizing the ITZ crystals ( $D_{90}$ : 39.6  $\mu\text{m}$ ) and the osmolarity was  $0.795 \pm 0.005$  Osm/Kg. In the **GT109** formulation, however, it was not possible to observe the presence of a polymeric "matrix", the ITZ crystals presented a  $D_{90}$  of 51.35  $\mu\text{m}$  and the formulation presented  $1.396 \pm 0.009$  Osm/Kg. The analytical method developed proved to be suitable for evaluating the impurity profile and ITZ content. In the clinical study, only the **GT64** formulation was evaluated, as it presented more promising characteristics. The results obtained so far provided evidence of the formulation's potential to contribute to the treatment of feline sporotrichosis.

Keywords: sporotrichosis; itraconazole; felines; treatment.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Histórico de eventos relacionados à esporotricose ao longo dos anos.....	18
<b>Figura 2:</b> Vias de transmissão da esporotricose em animais e seres humanos.....	22
<b>Figura 3:</b> Estrutura química do itraconazol.....	25
<b>Figura 4:</b> Metabólitos do itraconazol. Hidroxitraconazol (Painel A), ceto-itraconazol (Painel B) e N-desalquil-itraconazol (Painel C).....	27
<b>Figura 5:</b> Mecanismo de ação dos antifúngicos azólicos.....	28
<b>Figura 6:</b> Exemplos de mecanismos de resistência fúngica ao itraconazol.....	29
<b>Figura 7:</b> Esquema da câmara de Neubauer com respectivos quadrantes indicados pelas letras A, B e C.....	50
<b>Figura 8:</b> Representação esquemática da placa de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em cepas de <i>S. brasiliensis</i> .....	51
<b>Figura 9:</b> Etapas do teste de degradação forçada.....	56
<b>Figura 10:</b> Caracterização da formulação <b>GT64</b> .....	68
<b>Figura 11:</b> Curva de viscosidade e de fluxo da formulação GT64 e de seu respectivo placebo	69
<b>Figura 12:</b> Cromatogramas obtidos durante o desenvolvimento do método analítico.....	73
<b>Figura 13:</b> Cromatogramas obtidos na etapa de avaliação da seletividade do método analítico.....	75
<b>Figura 14:</b> Formulação <b>GT64</b> gelificada após autoclavação.....	82
<b>Figura 15:</b> Caracterização da formulação <b>GT109</b> .....	84
<b>Figura 16:</b> Microscopia de luz polarizada da formulação <b>GT109</b> após autoclavação a 127 °C, 5 min. (A) campo claro e (B) campo escuro. Aumento de 200x.....	85
<b>Figura 17:</b> (A) Formulação <b>GT64</b> e (B) <b>GT109</b> antes da irradiação, (C) Formulação <b>GT64</b> e (D) <b>GT109</b> após.....	87
<b>Figura 18:</b> Caracterização da formulação <b>GT64</b> após irradiação.....	87
<b>Figura 19:</b> Caracterização da formulação <b>GT109</b> após esterilização.....	88

<b>Figura 20:</b> Cromatogramas das formulações <b>GT64</b> e <b>GT109</b> (pré e pós irradiação).....	92
<b>Figura 21:</b> Evolução das lesões do felino 01 (Clara) no decorrer do tratamento com a formulação <b>GT64</b> .....	94
<b>Figura 22:</b> Evolução das lesões do felino 02 (Tigrado) no decorrer do tratamento com a formulação <b>GT64</b> .....	95
<b>Figura 23:</b> Evolução das lesões do felino 03 (Jane) no decorrer do tratamento com a formulação <b>GT64</b> .....	96
<b>Figura 24:</b> Evolução das lesões do felino 04 (Jolie) no decorrer do tratamento com a formulação <b>GT64</b> .....	97
<b>Figura 25:</b> Evolução das lesões do felino 05 (Romeu) no decorrer do tratamento com a formulação <b>GT64</b> .....	97
<b>Figura 26:</b> Evolução da lesão do felino 06 (Salomão) no decorrer do tratamento com a formulação <b>GT64</b> .....	99
<b>Figura 27:</b> Evolução da lesão do felino 08 (Bitoca) no decorrer do tratamento com a formulação <b>GT64</b> .....	100
<b>Figura 28:</b> Evolução da lesão do felino 09 (Magno) no decorrer do tratamento com a formulação <b>GT64</b> .....	100
<b>Figura 29:</b> Evolução da lesão do felino 10 (Bonitinho) no decorrer do tratamento com a formulação <b>GT64</b> .....	101
<b>Figura 30:</b> Perfil bioquímico dos felinos em tratamento com a formulação <b>GT64</b> .....	103
<b>Figura 31:</b> Hemograma dos felinos em tratamento com a formulação <b>GT64</b> .....	104

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Tabela de termos descritivos de solubilidade.....	44
<b>Tabela 2:</b> Condições cromatográficas do método analítico para determinação do teor do itraconazol e quantificação de impurezas na formulação <b>GT64</b> .....	52
<b>Tabela 3:</b> Eluição por gradiente - fase 1 do desenvolvimento do método analítico para doseamento do itraconazol e quantificação de impurezas na formulação.....	57
<b>Tabela 4:</b> Eluição por gradiente - fase 2 do desenvolvimento do método analítico para doseamento do itraconazol e quantificação de impurezas na formulação.....	57
<b>Tabela 5:</b> Codificação e função farmacotécnica dos excipientes utilizados no desenvolvimento da formulação proposta.....	63
<b>Tabela 6:</b> Resultados do teste de solubilidade mínima do itraconazol (ITZ) em diferentes excipientes aprovados para administração parenteral na área veterinária.....	64
<b>Tabela 7:</b> Análise do tamanho das partículas presentes nas formulações carregadas com itraconazol ( <b>GT64</b> ) e seu respectivo placebo ( <b>PGT64</b> ).....	70
<b>Tabela 8:</b> Recuperação do ITZ nas amostras da formulação <b>GT64</b> submetidas às diferentes condições de estresse.....	74
<b>Tabela 9:</b> Adequabilidade do sistema do método de impurezas (2,5 mg de ITZ/mL).....	76
<b>Tabela 10:</b> Análise da pureza cromatográfica do itraconazol.....	77
<b>Tabela 11:</b> Decaimento no teor de itraconazol nas amostras da formulação <b>GT64</b> submetidas a diferentes condições de estresse.....	78
<b>Tabela 12:</b> Percentuais de degradação do itraconazol sob diferentes condições de estresse observadas no presente estudo e em trabalhos descritos na literatura.....	79
<b>Tabela 13:</b> Impurezas presentes na solução do insumo farmacêutico ativo e na formulação <b>GT64</b> , com e sem condição de estresse.....	80
<b>Tabela 14:</b> Balanço de massa das amostras <b>GT64.1</b> e <b>GT64.2</b> .....	81
<b>Tabela 15:</b> Valores de pH obtidos para as formulações <b>GT64</b> e <b>GT109</b> , e seus respectivos placebos, antes e após a esterilização por radiação gama .....	89

<b>Tabela 16:</b> Faixa de tamanhos obtida para as partículas das formulações <b>GT64</b> e <b>GT109</b> pré e pós-irradiação.....	89
<b>Tabela 17:</b> Valores de osmolaridade (cálculo teórico e medição em osmômetro criométrico).....	90
<b>Tabela 18:</b> Teor e impurezas das formulações <b>GT64</b> e <b>GT109</b> (pré e pós-irradiação).....	90
<b>Tabela 19:</b> Teor da formulação <b>GT64</b> pré e pós-irradiação.....	91

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

AUC	Área Sob a Curva ( <i>Area Under the Curve</i> )
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHI	Infusão de Cérebro e Coração ( <i>Brain Heart Infusion</i> )
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CDTN	Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear
$C_{max}$	Pico de Concentração Plasmática
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CHCM	Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média
Ci	Curie
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLN	Carreadores Lipídicos Nanoestruturados
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DAS	Ágar Sabouraud Dextrose ( <i>Sabouraud Dextrose Agar</i> )
DL	Dose Letal
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPR	Desvio Padrão Relativo
Eq	Equivalente
FAFAR	Faculdade de Farmácia
i	Constante de Ionização da Molécula

IFA	Insumo Farmacêutico Ativo
IV	Intravenoso
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
ITZ	Itraconazol
KGy	Kilograys
LAMICO EV	Laboratório de Micologia e Micotoxinas da Escola de Veterinária
LIG	Laboratório de Irradiação Gama
µm	Micromolar
M	Molar
mM	Milimolar
Mv	Milivolts
Min	Minuto(s)
MOPS	Ácido 3-[N-Morfolino] propanosulfônico ( <i>3-morpholinopropane-1-sulfonic acid</i> )
N	Normalidade
NaOH	Hidróxido de Sódio
ng/L	Nanograma(s) por Litro
ng/mL	Nanograma(s) por Mililitro
nm	Nanômetro(s)
ONG	Organização Não Governamental
Osm/Kg	Osmol por Kilo

PEG	Polietilenoglicol
PM	Peso Molecular
p/p	Peso por Peso
pH	Potencial Hidrogeniônico
q.s.p	Quantidade Suficiente Para
rpm	Rotações por Minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SC	Subcutâneo
SEDDS	Sistemas de Entrega de Drogas Autoemulsionantes ( <i>Self-emulsifying drug delivery systems</i> )
TGP	Alanina Aminotransferase
TGO	Asparto Aminotransferase
TBq	Terabecquerel
T <sub>max</sub>	Tempo até obtenção do Pico de Concentração Plasmática
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
USP	<i>United State Pharmacopeia</i>
UV	Ultravioleta
VCM	Volume Corpuscular Médio
VR	Valor de Referência

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	18
2.1 Esporotricose .....	18
2.2 Itraconazol - aspectos farmacológicos .....	24
2.3 Desenvolvimento de novas formulações a base de itraconazol .....	31
3 OBJETIVOS .....	41
3.1 Objetivo geral .....	41
3.2 Objetivos específicos .....	41
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	42
4.1 Material .....	42
4.2 Métodos .....	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
5.1 Estudos de pré-formulação .....	63
5.2 Caracterização da formulação .....	67
5.3 Determinação de sensibilidade dos isolados de <i>Sporothrix brasiliensis</i> pelo método de concentração inibitória mínima .....	71
5.4 Desenvolvimento do método analítico para determinação de impurezas e teor do ITZ por CLAE .....	72
5.5 Esterilização terminal da formulação GT64 por calor úmido .....	82
5.6 Reformulação da formulação GT64 .....	83



<b>5.7 Caracterização e demais informações a respeito da formulação GT109..</b>	<b>83</b>
<b>5.8 Esterilização das formulações GT64 e GT109 por radiação gama .....</b>	<b>86</b>
<b>5.9 Estudo clínico em gatos com esporotricose .....</b>	<b>92</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>106</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>107</b>
<b>ANEXO I .....</b>	<b>126</b>
<b>ANEXO II .....</b>	<b>127</b>
<b>ANEXO III .....</b>	<b>129</b>
<b>ANEXO IV .....</b>	<b>130</b>
<b>ANEXO V .....</b>	<b>132</b>
<b>ANEXO VI .....</b>	<b>134</b>
<b>ANEXO VII .....</b>	<b>136</b>
<b>ANEXO VIII .....</b>	<b>138</b>
<b>ANEXO IX .....</b>	<b>140</b>
<b>ANEXO X .....</b>	<b>142</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma infecção fúngica crônica causada por espécies do gênero *Sporothrix*, sendo *S. brasiliensis* e *S. schenckii* as espécies de maior relevância. A espécie *S. brasiliensis* é o principal agente da esporotricose felina no Brasil; já *S. schenckii* possui ampla distribuição geográfica (FERREIRA, 2016; CABAÑES, 2020). O gênero *Sporothrix* apresenta morfologias distintas, de acordo com sua fase de vida. A forma saprofítica filamentosa é encontrada em solos ricos em matéria orgânica, a 25 °C e umidade elevada. Já a forma leveduriforme, que é a parasitária no homem e outros animais, se desenvolve a 37 °C (LACAZ *et al.*, 2002; CABAÑES, 2020).

A contaminação clássica em seres humanos ocorre a partir da inoculação cutânea ou subcutânea traumática da forma filamentosa, presente em madeiras, galhos e espinhos contaminados, fazendo com que seja relacionada a profissões de jardineiros e floristas (FERREIRA, 2016; CABAÑES, 2020). Entretanto, animais que possuem a doença são considerados reservatórios e podem transmitir a doença aos seres humanos. Por meio de mordidas ou arranhões, o animal pode inocular as formas leveduriforme ou filamentosa do fungo; a contaminação também pode ocorrer pelo simples contato direto com a lesão do animal (THOMSON *et al.*, 2019). Portanto, o controle da doença nos animais favorece o controle da doença nos seres humanos.

Uma vez infectado, a evolução clínica no ser humano dependerá do seu estado imunológico, da carga inoculada e da patogenicidade do fungo. Em pacientes imunossuprimidos podem ser observados quadros de endocardite, comprometimento da mucosa nasal e ocular, e meningoencefalite, que pode levar ao óbito (BARROS *et al.*, 2011; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2019). Atualmente, a Organização Mundial de Saúde considera a esporotricose uma das principais infecções fúngicas tropicais negligenciadas para 2021-2030 (WHO, 2020).

Embora a esporotricose possa acometer cães, ratos e outros pequenos animais, os gatos são os principais animais afetados (FIOCRUZ, 2015). Na esporotricose felina o animal infectado, após um período que pode variar de alguns dias a semanas, desenvolve uma lesão inicial no local da inoculação. Essa lesão é nodular e firme,

tornando-se macia (“gomosa”) com o tempo. De modo geral, ocorre a liberação de sangue e exsudato purulento das feridas formadas (LARSSON *et al.* 1989; KAUFFMAN, 1999). Assim, o fungo pode se disseminar por meio da autoinoculação, enquanto o felino se coça ou se lambe, levando à colonização das unhas e cavidade oral (SCHUBACH *et al.*, 2001).

O tratamento da esporotricose em felinos é desafiador (GREMIÃO *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2014). As opções terapêuticas viáveis são os imidazóis, a exemplo do cetoconazol; os triazólicos, como o itraconazol (ITZ) e fluconazol; os iodetos de sódio e potássio, a terbinafina, a anfotericina B; a remoção cirúrgica das lesões, termoterapia local e a criocirurgia (PEREIRA *et al.*, 2009; 2014).

A escolha do ITZ para tratamento da esporotricose se baseia nos bons resultados na cicatrização das lesões, além da boa tolerabilidade (ANTUNES *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2010). Contudo, devido à necessidade de um tratamento prolongado e regular, uma baixa adesão ao tratamento é observada, principalmente no caso dos felinos. A baixa adesão decorre da dificuldade dos tutores em administrarem diariamente o medicamento por via oral aos gatos; além do custo elevado do tratamento (SCHUBACH, 2004).

Diante do exposto, há a demanda para o desenvolvimento de uma nova forma de tratamento da doença, com foco no tratamento dos felinos, os principais reservatórios da esporotricose. Assim, este trabalho tem como objetivo desenvolver, caracterizar e avaliar a eficácia de uma suspensão injetável de ITZ para o tratamento da esporotricose com foco inicial em felinos, com vistas a otimizar o tratamento e reduzir o contágio felino-felino e felino-humano.

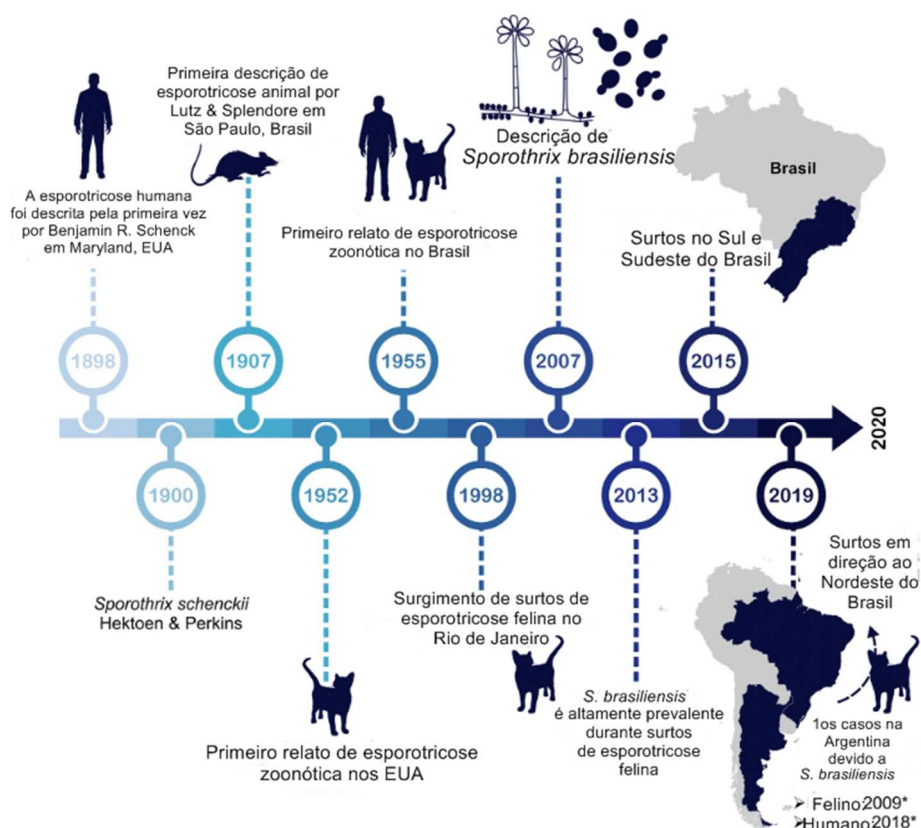
## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Esporotricose

#### 2.1.1 Histórico

Em 1809 e 1889 foram feitas as primeiras menções, por Linck e Lutz respectivamente, sobre a possível ocorrência da esporotricose. Contudo, não foi possível realizar o isolamento do patógeno em ambos os casos, a fim de se confirmar os casos (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992). Em 1898, o primeiro caso de esporotricose foi confirmado por Benjamin Schenck nos Estados Unidos, em um homem de 36 anos, que apresentava lesões na mão e no braço direito. As secreções retiradas dos abscessos das lesões foram estudadas pelo micologista Erwin Smith, que chegou à conclusão que o fungo em questão pertencia ao gênero *Sporotrichum* (SCHENCK, 1898) (**Figura 1**).

**Figura 1:** Histórico de eventos relacionados à esporotricose ao longo dos anos.  
(Rodrigues *et al.*, 2020. Adaptado).



O segundo caso de esporotricose relatado também ocorreu nos Estados Unidos, sendo descrito por Hektoen & Perkins em 1900. O paciente em questão apresentou

uma lesão no dedo após ter se ferido com um martelo, mas a lesão regrediu espontaneamente. Hektoen & Perkins foram responsáveis pela denominação do fungo, conhecido como *Sporothrix schenckii* (HEKTOEN & PERKINS, 1900).

Já no Brasil, o primeiro caso de infecção natural foi descrito por Lutz e Splendore em 1907, onde foi considerada a hipótese de contaminação de seres humanos por meio da mordedura de ratos (LUTZ & SPLENDORE, 1907). A partir de então, na maioria dos continentes, casos isolados e surtos têm sido relatados, com destaque para o número de ocorrências no Rio de Janeiro (GUTIERREZ-GALHARDO *et al.*, 2015).

### 2.1.2 Morfologia e fisiologia do gênero *Sporothrix*

A esporotricose é uma infecção fúngica crônica causada por fungos dimórficos do gênero *Sporothrix*, que é composto por clados de diferentes espécies, como *S. brasiliensis*, *S. chilensis*, *S. globosa*, *S. luei*, *S. mexicana* e *S. pallida* (MARIMON *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2015, DE BEER *et al.*, 2016). Os fungos pertencentes ao gênero *Sporothrix* são encontrados comumente na vegetação, no solo e matéria orgânica em decomposição (BARROS *et al.*, 2011; CABAÑES, 2020). As espécies *S. brasiliensis* e *S. schenckii* apresentam maior potencial de virulência para o ser humano, sendo a primeira a principal causadora da esporotricose em território brasileiro e a segunda com ampla distribuição geográfica (FERREIRA, 2016; CABAÑES, 2020).

Os fungos do gênero *Sporothrix* apresentam morfologias distintas, de acordo com a fase de vida. São encontrados nas formas saprofítica filamentosa em solos ricos em matéria orgânica (temperatura de aproximada 25 °C e umidade elevada); e na forma de levedura, que parasita o homem e outros animais, na qual a temperatura aproximada é de 37 °C (LACAZ *et al.*, 2002; CABAÑES, 2020).

A morfologia saprofítica filamentosa pode ser encontrada na forma de estruturas como hifas hialinas, septadas, ramificadas, com conídios unicelulares, os quais não possuem capacidade de realizar a formação de cadeias (SIGLER *et al.*, 1990; ST-GERMAIN & SUMMERBELL, 1996; OLIVEIRA, 2009). Já a forma parasitária pode ser encontrada como leveduras unicelulares globosas, ovaladas e em forma de

charuto, as quais podem apresentar um ou mais brotamentos (CHANDLER *et al.*, 1980; RAMOS & SILVA *et al.*, 2007; OLIVEIRA, 2009).

### 2.1.3 Epidemiologia

Apesar de possuir ocorrência mundial, a distribuição da esporotricose não é homogênea em todos os países (GUTIERREZ-GALHARDO *et al.*, 2015). No mundo, é tida como dermatose ocupacional em humanos, visto que se encontra associada a atividades como agricultura e jardinagem, com predomínio das espécies *S. schenckii* e *S. globosa*. A primeira espécie apresenta maior distribuição pelo mundo e a segunda está relacionada a grandes surtos na região asiática (ZHANG *et al.*, 2015; LOPES-BEZERRA *et al.*, 2018; CABAÑES, 2020).

Em todo o mundo, epidemias envolvendo grande número de pessoas ou amplas regiões geográficas são raras (OLIVEIRA, 2009). Um exemplo de epidemia da doença ocorreu na África do Sul, onde trabalhadores que atuavam em uma mina foram infectados devido à contaminação das madeiras pelo fungo (QUINTAL, 2000; OLIVEIRA, 2009). Outro exemplo de epidemia de esporotricose ocorreu nos Estados Unidos, sendo relacionada a um tipo de musgo contaminado por *S. schenckii* (COLES *et al.*, 1992; OLIVEIRA, 2009). Na Austrália também foram relatados casos de esporotricose devido a exposição ao fungo presente no feno (O'REILLY & ALTMAN, 2006; OLIVEIRA, 2009).

No Brasil, altas taxas da doença em humanos tem ocorrido devido à transmissão zoonótica, relatada desde 1998 no Rio de Janeiro e em São Paulo. No entanto, atualmente, já existem relatos da doença em praticamente todos os estados brasileiros (DA ROSA *et al.*, 2005; COLODEL *et al.*, 2009; MARQUES-MELO *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2014; GUTIERREZ-GALHARDO *et al.*, 2015; ARAUJO & LEAL, 2016; LOPES-BEZERRA, 2018).

No Rio de Janeiro, devido ao elevado número de gatos em situação de rua, mais de 5000 casos da doença foram detectados nos últimos anos. Já em Minas Gerais, casos de esporotricose felina passaram a ser identificados em 2015 na região metropolitana de Belo Horizonte e, atualmente, casos humanos também são relatados. É válido destacar que, assim como no Rio de Janeiro, a esporotricose também apresenta caráter zoonótico em Belo Horizonte e, de modo geral, o

aumento na ocorrência de casos em seres humanos está relacionado com o crescimento da população felina (SANTOS *et al.*, 2018; CABAÑES, 2020).

Alguns dos fatores que podem acarretar maior ocorrência da esporotricose no Brasil são: ausência de programa abrangente para o controle da esporotricose felina, a dificuldade no manejo de gatos doentes e o desconhecimento por parte da população sobre as medidas de controle da doença (GREMIÃO *et al.*, 2020).

#### 2.1.4 Espécies acometidas

Várias são as espécies de animais que podem ser afetadas pela esporotricose, a exemplo de carnívoros domésticos, primatas, bovinos, camelídeos, caprinos, suínos, aves e artrópodes, sendo que todos esses animais podem servir como fonte de infecção para o ser humano (LARSSON, 2011).

No Brasil, o cão tem sido relatado como uma das espécies acometida. Schubach *et al.* (2008) relataram 1.503 gatos e 64 cães acometidos por fungos do gênero *Sporothrix* no Rio de Janeiro. Ao contrário dos felinos, os canídeos apresentam uma carga fúngica menor nas lesões e a contaminação desses animais ocorre, de modo geral, após contato, normalmente por meio de brigas com gatos infectados; ou por meio de lesões ocasionadas por troncos e galhos (SCHUBACH *et al.*, 2006; SCHUBACH, 2013). Uma observação importante em relação ao diagnóstico da doença nos canídeos é a realização do diagnóstico diferencial para leishmaniose, uma vez que as lesões macroscópicas podem ser similares (MADRID *et al.*, 2007; LARSSON, 2011).

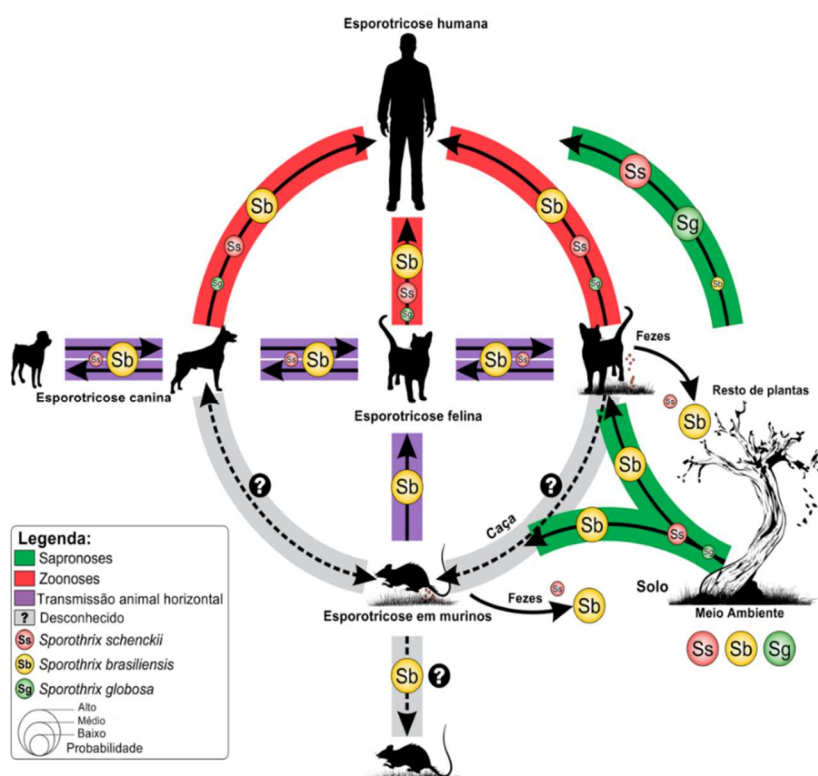
Assim, a espécie felina é a principal envolvida na transmissão zoonótica da esporotricose, principalmente devido à maior carga fúngica nas lesões e aos hábitos de vida (SCHUBACH, 2013; CABAÑES, 2020). De fato, comportamentos como a arranhadura de troncos de árvores e plantas, o hábito de enterrar as fezes e a lambadura de seus corpos facilita o transporte de partículas fúngicas nas unhas, cavidade oral e nasofaringe, o que faz com que os felinos corram maior risco de contaminação por fungos pertencentes ao gênero *Sporothrix* (SCHUBACH *et al.*, 2001; MADRID *et al.*, 2012; CABAÑES, 2020).

#### 2.1.5 Transmissão para seres humanos

A esporotricose tem um histórico de ocorrência predominantemente em pessoas que manipulavam a terra, como jardineiros e trabalhadores rurais. Contudo, atualmente, a transmissão zoonótica tem ganhado relevância, ocorrendo por meio da arranhadura ou mordedura de animais contaminados ou contato direto da pele lesionada ou mucosa com lesões e/ou secreções, em especial de gatos infectados (BARROS *et al.*, 2001; GREMIÃO *et al.*, 2017; CABAÑES, 2020). A inalação de conídios também é uma via de transmissão da doença, mas é mais rara e grave, pois pode causar a forma sistêmica da esporotricose, principalmente em pessoas imunologicamente debilitadas (ALMEIDA, 2015). A **Figura 2** ilustra vias de transmissão da esporotricose em animais e humanos.

**Figura 2:** Vias de transmissão da esporotricose em animais e seres humanos.

(Rodrigues *et al.*, 2016. Adaptado).



### 2.1.6 Patogenia e diagnóstico clínico da esporotricose felina

Nos gatos infectados, a apresentação clínica da esporotricose pode ser variada. O animal desenvolve uma lesão inicial no local da inoculação, a qual é nodular e firme e pode ou não evoluir para extensas áreas de necrose, com exposição de tecidos. Na maioria dos casos, ocorre liberação de sangue e exsudato purulento das feridas



formadas (LARSSON *et al.* 1989; KAUFFMAN, 1999). A ocorrência de espirros, secreção nasal e dispneia também são ocorrências comumente observadas (SCHUBACH *et al.*, 2004). Segundo um estudo realizado por Pereira *et al.* (2010), animais com sinais respiratórios apresentam maior risco de falha do tratamento e, conseqüentemente, óbito.

Os locais de aparecimento das feridas no corpo são aqueles que são mais atingidos durante as brigas, como as extremidades dos membros e a cauda. No entanto, qualquer parte do corpo pode ser afetada. Quando as lesões aparecem na cabeça, as feridas concentram-se, de modo geral, no plano nasal, na pila e na região periocular (PEREIRA *et al.*, 2010; SCHUBACH *et al.* 2012). A ocorrência de anorexia, desidratação e perda de peso são sinais clínicos inespecíficos que também podem estar presentes (SCHUBACH *et al.*, 2004).

O diagnóstico da esporotricose em gatos pode ser realizado pela visualização das leveduras do fundo no material exsudativo por meio da técnica de Gram. A cultura fúngica também pode ser empregada através do isolamento da forma micelial do fungo via inoculação do material coletado em meio Sabouraud Dextrose acrescido de cloranfenicol e cicloheximida, com incubação de 25 a 29°C (15 dias). Posteriormente, a forma micelial é incubada em ágar infusão de cérebro e coração (BHI) a 37°C, visando-se obter a forma leveduriforme do fungo (ALMEIDA *et al.*, 2018).

#### 2.1.7 Manejo da esporotricose felina

As opções terapêuticas disponíveis para o tratamento da esporotricose felina são: itraconazol (ITZ), cetoconazol, posaconazol e fluconazol, iodetos de sódio e potássio, terbinafina, anfotericina B, remoção cirúrgica das lesões, termoterapia local e criocirurgia (PEREIRA *et al.*, 2009; 2014). Alguns fatores podem dificultar a cura da esporotricose felina, como tratamento prolongado e regular, dificuldade na administração por via oral, custo elevado e recidivas (SCHUBACH, 2004). O ITZ, um derivado triazólico de primeira geração e amplo espectro, é o fármaco de escolha para o tratamento de formas cutâneas e subcutâneas em humanos e animais devido ao bom desempenho no processo de cicatrização das lesões e tolerabilidade (ANTUNES *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2010).

As doses de ITZ especificadas na literatura científica para o tratamento da esporotricose felina são: 100 mg/dia via oral para gatos com peso igual ou superior a 3 Kg; 50 mg/dia via oral para gatos como peso entre 1 e 3 Kg; 25 mg/dia via oral para gatos com peso inferior à 1 Kg (GREMIÃO *et al.*, 2020). São descritas também doses de 10 mg/Kg, via oral, uma vez ao dia (MADRID *et al.*, 2010; LLORET *et al.*, 2013; ROSSI E LARSSON, 2013). O tempo de tratamento é prolongado, visto que deve ser mantido por, no mínimo, um mês após a cura clínica (TABOADA, 2004). Durante o tratamento, é necessário o monitoramento das enzimas hepáticas dos animais, devido ao potencial efeito hepatotóxico do ITZ (SCHUBACH *et al.*, 2012).

A solução supersaturada de iodeto de potássio por via oral também é usada em gatos (2,5 a 20 mg/kg a cada 24 h); mas os efeitos hepatotóxicos são mais frequentes (REIS *et al.*, 2012). A associação de iodeto de potássio aos azólicos e à terbinafina também é sugerida (SCHUBACH *et al.*, 2012). Como os felinos são sensíveis aos iodetos, devem ser monitorados quanto a sinais de iodismo, como depressão, anorexia, vômito ou diarreia (NOBRE *et al.*, 2002). O cetoconazol (5 a 10 mg/kg, via oral, 1-2x ao dia) também é utilizado na esporotricose felina, mas pode causar uma gama maior de efeitos colaterais (SCHUBACH *et al.*, 2004). A anfotericina B intralesional associada ao ITZ oral pode ser é uma opção de tratamento para a esporotricose felina refratária (GREMIÃO *et al.*, 2009).

#### 2.1.8 Prevenção e controle

Como formas de prevenção da esporotricose, com destaque para doença em felinos, a educação da guarda responsável, a castração, o tratamento, a eutanásia dos casos sem possibilidade terapêutica, e a destinação correta dos cadáveres dos animais mortos em decorrência da doença constituem medidas de suma importância. No entanto, o abandono e a morte de gatos doentes são muito comuns quando os tutores contraem a doença, na tentativa de prevenir a ocorrência de outros casos em suas residências; devido ao desconhecimento ou à impossibilidade de realizar o tratamento (BARROS *et al.*, 2010).

### 2.2 Itraconazol - aspectos farmacológicos

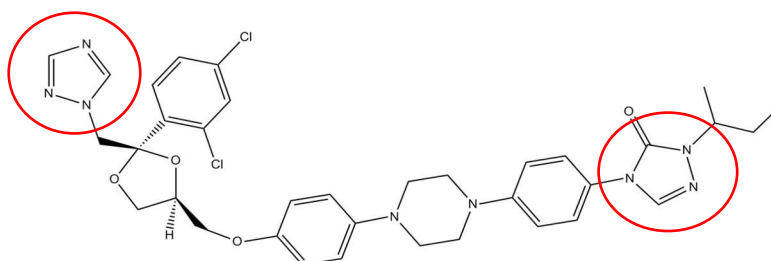
O ITZ é o fármaco de primeira escolha para o tratamento da esporotricose humana e na medicina veterinária. No entanto, outros antifúngicos são também utilizados

na medicina humana, como o iodeto de potássio, a terbinafina e o complexo lipídico de anfotericina B. Já na medicina veterinária, o ITZ é mais amplamente utilizado, sendo possível identificar na literatura científica inúmeros exemplos de aplicação do ITZ na terapia antifúngica de várias espécies animais, nas mais variadas posologias e tempos de tratamento.

### 2.2.1 Aspectos farmacológicos e farmacodinâmicos

O ITZ (*cis*-4[4-4-4[[2-(2,4-diclorofenil)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-metil)-1,3-dioxolan-4-il]-1-piperazinil]fenil]-2,4-dihidro-2-(1-metil-propil)-3H-1,2,4-triazol-3-ona, **Figura 3**) é um antifúngico que possui em sua estrutura o anel triazol. Este anel é responsável pelo amplo espectro de ação e perfil de segurança melhorado, quando comparado a outras classes de antifúngicos (GIRMENIA, 2009; SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015; EMAMI *et al.*, 2017).

**Figura 3:** Estrutura química do itraconazol.



O ITZ é comercializado principalmente na forma de cápsulas (Sporanox<sup>®</sup> 100 mg), suspensão oral (Sporanox<sup>®</sup>, 10 mg/mL) e formulações injetáveis (Sporanox<sup>®</sup>, 10 mg/mL). As duas últimas formulações disponíveis são formuladas com hidroxipropil-β-ciclodextrina, formando complexos solúveis em água com o ITZ devido à formação de complexos com núcleos hidrofóbicos e superfície externa hidrofílica (KELLER, 2011; LESTNER & HOPE, 2013).

### 2.2.2 Farmacodinâmica

Assim como os demais fármacos azólicos, o ITZ atua principalmente através da alteração da síntese de ergosterol nas células fúngicas. O ITZ apresenta amplo espectro de ação, sendo capaz de inibir o crescimento de várias espécies fúngicas patogênicas para o ser humano e outros animais, como dermatófitos (*Trichophyton* spp. e *Microsporum* spp.); leveduras (*Cryptococcus neoformans* e *Malassezia* spp.);

*Histoplasma* spp.); entre vários outros. Contudo, o ITZ, de modo geral, não apresenta ação em fungos como *Zygomycetos*, *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp., e *Scopulariopsis* spp. (SUN *et al.*, 2002; CUENCA-ESTRELLA *et al.*, 2003; GAVIRIA-RIVERA *et al.*, 2017).

### 2.2.3 Farmacocinética

#### 2.2.3.1 Absorção

Para o uso humano, o ITZ é comercializado na forma de cápsulas, suspensão oral e formulações injetáveis, estando nas duas últimas formas farmacêuticas solubilizado através da complexação com ciclodextrinas, já para o uso veterinário, o ITZ encontra-se disponível principalmente na forma de cápsulas (KELLER, 2011). Uma vez que é uma base fraca ( $pK_a = 3,7$ ), quando não se encontra complexado com ciclodextrinas, apresenta maior solubilidade em soluções ácidas (YIN *et al.*, 2015). Portanto, quando veiculado na forma de cápsulas, a maior absorção e biodisponibilidade ocorre com administração imediatamente após as refeições, pois o pH ácido auxilia na solubilização. Para as suspensões orais, a absorção é mais rápida e há maior biodisponibilidade quando administrado em jejum (VAN PEER *et al.*, 1989; VAN DE VELDE *et al.*, 1996; BARONE *et al.*, 1998; WILLEMS *et al.*, 2001; DAVIS *et al.*, 2005; BUNTING *et al.*, 2009; SMITH *et al.*, 2010; ANVISA, 2019).

#### 2.2.3.2 Distribuição

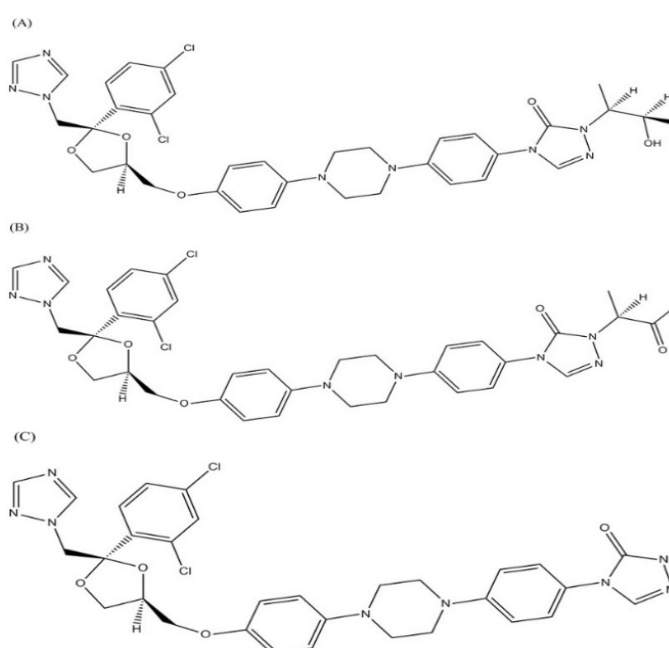
A maior parte do ITZ que se encontra disponível no plasma fica quase totalmente ligada a proteínas plasmáticas, além de apresentar ampla distribuição em tecidos, com destaque para tecidos lipofílicos, a exemplo da pele (WILLEMS *et al.*, 2001; PLUMB, 2005; DAVIS *et al.*, 2005; ANVISA, 2019). A ligação a proteínas plasmáticas pode atuar como um complexo que funciona, por sua vez, como um sistema de reservatório ou depósito dinâmico, que pode levar à liberação do fármaco no local da infecção por vários dias (ASCENZI *et al.*, 2014; DONCKER *et al.*, 1997). Por esta razão, há protocolos com ciclos pulsáteis de ITZ, sendo alternadas as semanas de administração (INGBER, 2001; ZHOU *et al.*, 2021).

#### 2.2.3.3 Metabolização

A metabolização do ITZ pelo fígado ocorre principalmente por meio da enzima

CYP3A4, dando origem a metabólitos como ceto-itraconazol, *N*-desalquil-itraconazol e hidroxitraconazol, este último apresentando atividade comparável à do ITZ (**Figura 4**) (WILLEMS *et al.*, 2001; PLUMB, 2005; KUNZE *et al.*, 2006; ANVISA, 2019). Contudo, a produção de hidroxitraconazol como metabólito ocorre de modo diferente em humanos e em animais, podendo se observar tanto altas concentrações deste metabólito em comparação ao ITZ, quanto ausência de níveis plasmáticos mensuráveis (YOO *et al.*, 2002; DAVIS *et al.*, 2005).

**Figura 4:** Metabólitos do itraconazol. Hidroxitraconazol (Painel A), ceto-itraconazol (Painel B) e *N*-desalquil-itraconazol (Painel C).



#### 2.2.3.4 Excreção

O ITZ disponível de forma sistêmica passa por um extenso metabolismo oxidativo, gerando grande número de metabólitos, os quais são excretados na forma inativa, principalmente pela bile (HARDIN *et al.*, 1988). Em seres humanos, uma menor parte não metabolizada (3 - 18%), pode ser detectada nas fezes (WILLEMS *et al.*, 2001; ANVISA, 2019). Nos animais, a excreção pode ocorrer de maneira diferente, alterando a forma e a porcentagem de metabólitos.

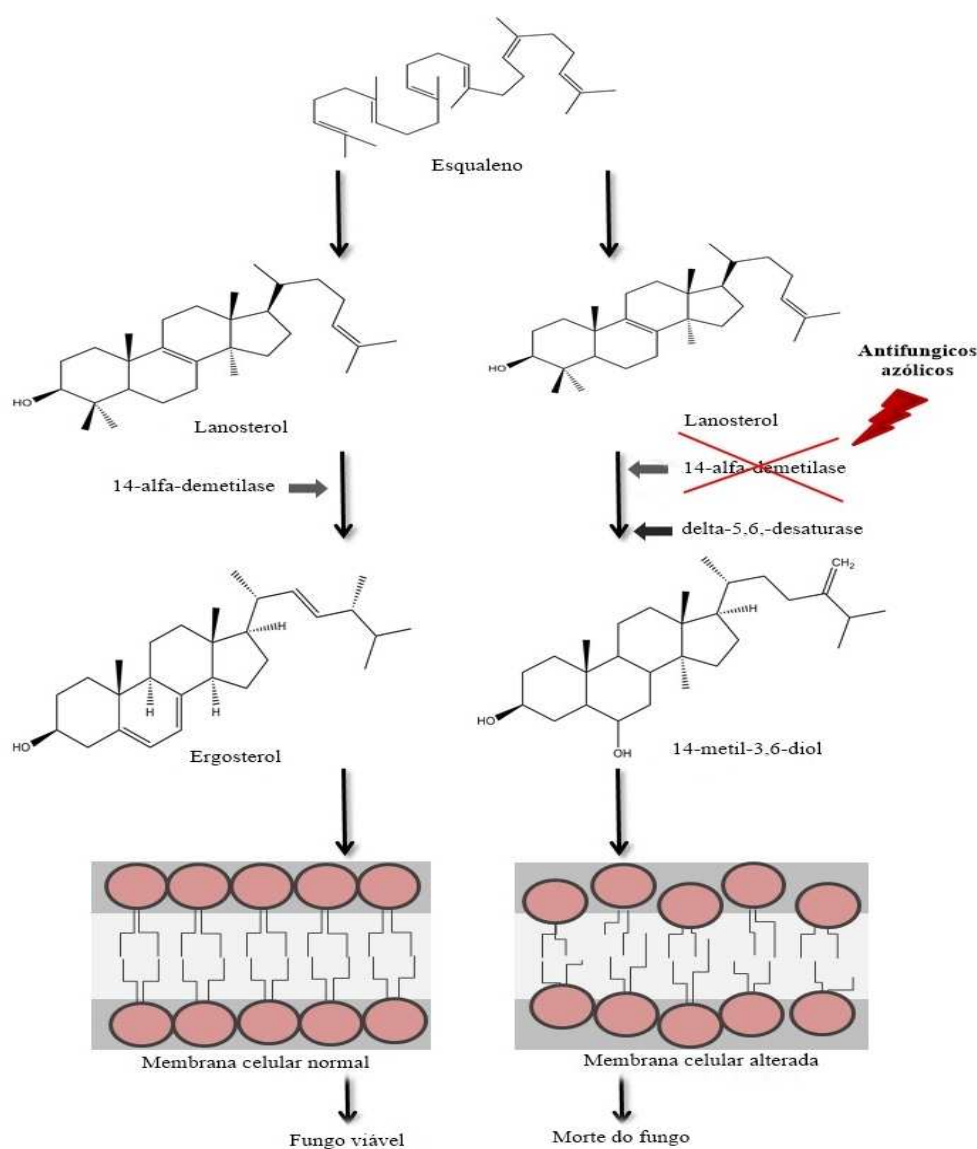
#### 2.2.3.5 Mecanismo de ação

A ação dos azóis ocorre via inibição das enzimas do citocromo P450 (CYP), as quais tem papel importante na biossíntese de esteróis, que são componentes vitais

das membranas celulares dos fungos. O alvo de atuação do ITZ é, mais especificamente, a enzima 14- $\alpha$ -desmetilase (também conhecida como ERG11, ERG16 e CYP51). A atuação sobre esta enzima leva ao bloqueio da biossíntese de ergosterol, acarretando a depleção de ergosterol e acúmulo de outros esteróis dentro das membranas celulares dos fungos, como os 14- $\alpha$ -metilesteróis. Esses metilesteróis levam à formação de membranas fúngicas com propriedades alteradas, fazendo com que não desempenhem as funções básicas necessárias, acarretando na morte do fungo (**Figura 5**) (WHITE *et al.*, 1998; LEMKE & WILLIAMS, 2002; LESTNER & HOPE, 2013).

**Figura 5:** Mecanismo de ação dos antifúngicos azólicos.

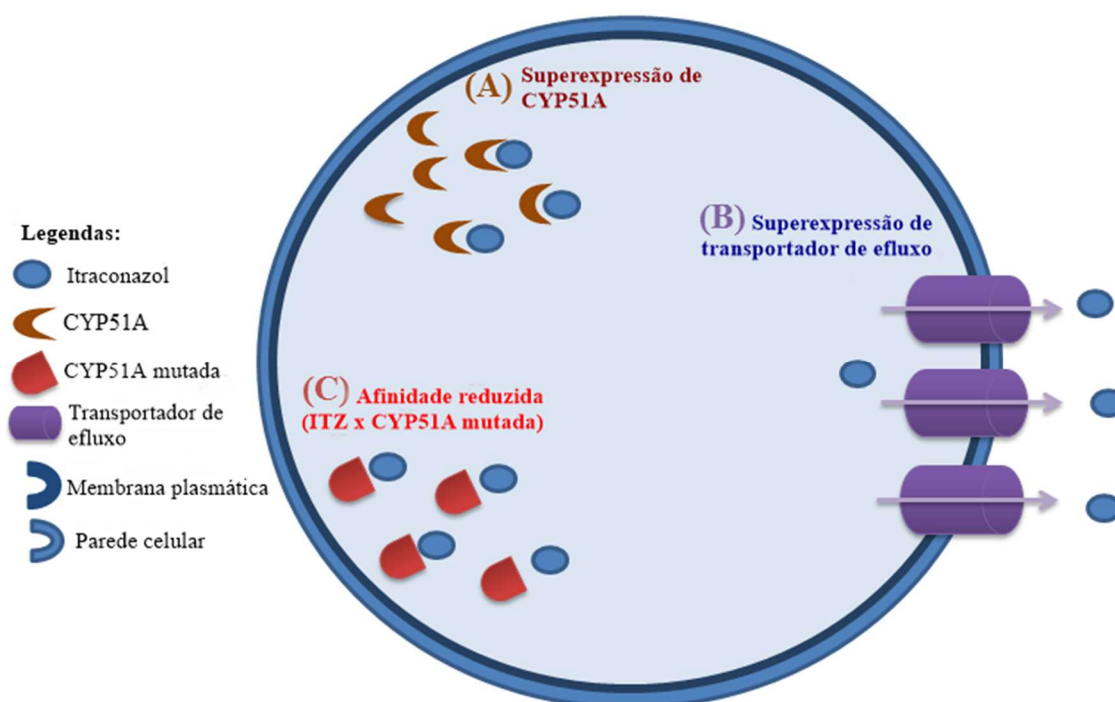
(Adaptado de Sueth-Santiago *et al.*, 2015).



### 2.2.3.6 Mecanismos de resistência

De modo geral, a resistência aos triazóis, como o ITZ, ocorre principalmente devido a mutações pontuais no gene que codifica a proteína alvo CYP51A. Essas mutações podem acarretar mudanças conformacionais da proteína, diminuindo a afinidade fármaco-alvo; presença de bombas de efluxo, que possibilitam a saída do fármaco do interior da célula fúngica, acarretando na menor concentração intracelular e diminuição da ação; ou regulação positiva de proteínas-alvo também são outros possíveis mecanismos de resistência (**Figura 6**) (BUIED *et al.*, 2013; LESTNER & HOPE, 2013).

**Figura 6:** Exemplos de mecanismos de resistência fúngica ao itraconazol.  
(Adaptado de Berger *et al.*, 2017).



A infecção com uma cepa de fungos resistente aos triazóis pode se desenvolver por meio da seleção *in vivo* em indivíduos com infecção fúngica crônica. Esses pacientes são, muitas vezes, expostos aos antifúngicos por períodos prolongados, variando de meses a anos. Adicionalmente, também pode ocorrer a infecção primária com cepas ambientais que já apresentam resistência adquirida, resultante do uso disseminado de compostos azólicos agrícolas, por exemplo (MORTENSEN *et al.*, 2010; LERTNER & HOPE, 2013).

### 2.2.3.7 Interações farmacológicas

Devido ao forte efeito de inibição sobre o CYP, o ITZ pode afetar a atividade de outros fármacos, assim como outros fármacos, podem alterar a atividade do ITZ (GLASMACHER *et al.*, 1996; LIU *et al.*, 2016). Exemplos de como o ITZ pode alterar a atividade de outras drogas são: prolongamento da sístole elétrica ventricular durante o tratamento com bloqueadores dos canais de cálcio e ivosidenib (SUNG *et al.*, 2012; DAI *et al.*, 2019), ou redução da depuração renal mediada pela P-glicoproteína nas células tubulares renais, levando ao aumento da concentração de digoxina (KIRSI-MAIJA *et al.*, 1997).

Por outro lado, indutores moderados ou potentes do CYP3A4, como a rifampicina, podem diminuir as concentrações terapêuticas do ITZ, uma vez que o ITZ é metabolizado principalmente pelo CYP3A4 (KALTANBACH *et al.*, 1996; JARURATANASIRIKUL & SRIWIRIYAJAN, 1998). O uso de inibidores da secreção ácida, como o omeprazol, pode reduzir a atividade do ITZ administrado por meio de cápsulas, pois a acidez gástrica melhora a solubilização do ITZ, conforme discutido acima (JARURATANASIRIKUL & SRIWIRIYAJAN, 1998); enquanto as bebidas ácidas à base de cola podem levar à melhoria de sua biodisponibilidade (LANGE *et al.*; JARURATANASIRIKUL & KLEEPKAEW, 1997; FOTAKI & KLEIN, 2013). Na área veterinária, ectoparasiticidas, como a deltametrina, podem induzir várias enzimas CYP e, conseqüentemente, diminuir as concentrações terapêuticas do ITZ (JOHRI *et al.*, 2006; ZIELKE *et al.*, 2018). Portanto, a correta avaliação da prescrição do medicamento, tanto para humanos quanto para animais, é um aspecto importante para evitar a ocorrência de reações adversas e melhorar a eficácia do tratamento.

### 2.2.3.8 Contraindicações

Como contraindicações, podem-se destacar os quadros alérgicos ligados ao ITZ, prenhez ou lactação, além da insuficiência cardíaca, uma vez que o ITZ pode causar agravamento desta última condição (ANVISA, 2019).

### 2.2.3.9 Efeitos adversos

Os efeitos adversos mais relatados ao uso do ITZ são: vômito, dor, náusea e distúrbios gastrointestinais, destacando-se a necessidade de monitoramento das



concentrações das enzimas hepáticas durante o tratamento, uma vez que o uso do fármaco pode causar hepatotoxicidade (MARTIN, 1999; ANVISA, 2019).

### **2.3 Desenvolvimento de novas formulações a base de itraconazol**

O ITZ é um fármaco que possui baixa solubilidade em água (KUMAR & GOINDI, 2014). No entanto, apesar de apresentar um log de P igual a 5,66, a solubilização e estabilização do ITZ em veículos oleosos não é fácil, fazendo com que seja melhor classificado como um fármaco hidrofóbico do que lipofílico (PAL *et al.*, 2015). Essas características do ITZ dificultam o desenvolvimento de formulações farmacêuticas e faz com que tenhamos poucas opções disponíveis no mercado, como explicitado acima. No Brasil, por exemplo, o ITZ é encontrado comercialmente disponível apenas na forma de cápsulas. Assim, na revisão abaixo, listamos as tecnologias que vêm sendo estudadas para carrear o ITZ.

#### *2.3.1 Microemulsões*

As microemulsões são dispersões compostas, de modo geral, por uma fase polar, uma fase apolar e um surfactante/emulsionante separando os domínios polares e apolares por meio da formação de um filme interfacial. De acordo com as características do fármaco, o mesmo pode ficar em uma das fases, ou mesmo na interface, sendo que a escolha da fase externa depende do local de administração. Dependendo da fase externa das microemulsões, podem ser produzidas do tipo óleo em água (O/A), nas quais a fase externa é água, ou água em óleo (A/O), nas quais a fase externa é óleo. De acordo com o tipo e a concentração do surfactante, assim como o tipo de processo, podem ser obtidas diferentes faixas de tamanho de glóbulos, sendo geralmente inferior a 1,0  $\mu\text{m}$  (GASCO, 1997; JULIAN *et al.*, 2006; WANZHONG *et al.*, 2006; ZHONG-MIN *et al.*, 2007; DESTREE *et al.*, 2008).

As microemulsões podem ser veiculadas pelas mais diversas vias (tópica, oral, parenteral). As microemulsões desenvolvidas para aplicação tópica têm como alvo o fornecimento de concentrações terapêuticas do fármaco nas camadas da pele, visando principalmente um efeito local, com destaque para a ação em tecidos injuriados, uma vez que a presença de lesões pode facilitar a permeação aprofundada do fármaco. O tratamento de várias doenças fúngicas superficiais pode ser realizado por meio da aplicação de antifúngico por via tópica, a exemplo

das dermatofitoses, as quais podem ser causadas por fungos pertencentes aos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* (KAUSHIK *et al.*, 2015; SHEN *et al.*, 2020). Alguns parâmetros importantes no desenvolvimento de formulações tópicas são: tamanho molecular, lipofilicidade, pH da formulação, concentração do fármaco e dos excipientes, hidratação e enzimas da pele (NAIR *et al.*, 2013).

Com o objetivo de aprimorar a aplicação tópica de ITZ, Kumar *et al.* (2014) desenvolveram uma microemulsão carregada com 0,70 mg ITZ/mL e gelificada com Carbopol. Esta formulação apresentou tamanho médio de glóbulos variando de 40 a 70 nm e potencial Zeta positivo (30 mV). Os estudos de permeação mostraram que a permeação de ITZ foi aproximadamente 4 e 1,87 vezes maior do que a permeação obtida para o creme convencional e o óleo, respectivamente. Na avaliação utilizando um modelo padrão de *Tinea pedis* em ratos Wistar, os animais foram divididos em quatro grupos de tratamento: hidrogel de microemulsão branco, hidrogel de microemulsão com ITZ, creme de cetoconazol e solução oral de ITZ-Ciclodextrina. Os resultados obtidos mostraram que o tratamento com a formulação desenvolvida resultou na remissão mais rápida da infecção (após 4 dias de tratamento). No caso dos animais tratados com creme de cetoconazol, houve alívio da coceira e das lesões avermelhadas em 6 dias, e a cura dos animais em 9 dias após o início do tratamento. Já os animais tratados com solução oral de ITZ, os sintomas da infecção só foram aliviados após 12 dias de tratamento.

Chudasama *et al.* (2011) também gelificaram microemulsões (glóbulos < 100 nm) carregadas com 1% de ITZ para aplicação tópica. As microemulsões foram incorporadas em géis poliméricos de Lutrol F127, goma xantana e Carbopol 934. Os estudos *in vitro* e testes de permeação cutânea mostraram que as microemulsões gelificadas com Lutrol F127 resultaram em melhor atividade antifúngica contra *Candida albicans*, sem a ocorrência de irritações ou eritema, além da obtenção da distribuição controlada do medicamento. Em outro estudo, Alam *et al.* (2010) desenvolveram uma microemulsão de ITZ (glóbulos < 80 nm), visando-se a aplicação transdérmica e a liberação sustentada e controlada do fármaco. Os resultados obtidos mostraram que a formulação desenvolvida apresentou melhor atividade contra *C. albicans* em testes *in vitro* com disco difusão,

além de taxa de permeação e o coeficiente de permeação significativamente maiores ( $p < 0,01$ ) em comparação com as formulações controle. A formulação controle A foi composta por 20 mg de ITZ em Tween-80:Transcutol P (3:1) e a controle B composta por 20 mg de ITZ em ácido oleico:miristato de isopropila (1:1). Uma avaliação de segurança foi conduzida através da administração única de 10  $\mu$ L da microemulsão na orelha esquerda de ratos Wistar albino, sendo a orelha direita considerada como controle.

As microemulsões também são avaliadas para uso parenteral, uma vez que a faixa de tamanho dos glóbulos é compatível com a via parenteral, além da possibilidade de esterilização por filtração. A via de administração parenteral compreende a administração pela via intra-arterial, intravenosa, intradérmica, intramuscular e subcutânea, e possui como vantagens a possibilidade de medicação em pacientes inconscientes ou que por algum motivo não podem tomar medicamentos pela via oral, rápido início da ação do fármaco, possibilidade de nutrição de pacientes hospitalizados e/ou acamados (GROVES, 1952; CHIEN, 1992; BRAZEAU *et al.*, 2007). Algumas desvantagens da via parenteral são: custo mais elevado das formulações, necessidade de técnicas especializadas para aplicação, maior incomodo durante a administração por parte do paciente e impossibilidade de reversão da administração da medicação.

Rhee *et al.* (2007) desenvolveram uma microemulsão O/A (glóbulos  $< 150$  nm) contendo ITZ a 1%. Testes em ratos Sprague-Dawley foram realizados por meio da administração das formulações (5 mg ITZ/kg) através do lado esquerdo da veia femoral a três grupos ( $n = 4$ ). Amostras de sangue foram retirados da veia jugular direita antes da administração e 5, 10, 30, 45 min, 1, 1,5, 2, 4, 8, 12 e 24 h após a administração do medicamento. Os resultados obtidos mostraram um valor de AUC 2,21 vezes maior e meia-vida 2,41 menor em comparação a formulação comercializada com base em hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina. Adicionalmente, o teste de hemólise forneceu evidências que a microemulsão desenvolvida não foi tóxica para os glóbulos vermelhos.

### 2.3.2 Microemulsões sólidas

Uma outra via para administração do ITZ por meio de microemulsões é a via oral, que apresenta vantagens como: maior facilidade de administração e adesão por parte do paciente; possibilidade de entrega de fármacos de forma sustentada e controlada; maior estabilidade da forma farmacêutica, em especial, no caso de formulações sólidas; e possibilidade de reversão da administração (CHOI *et al.*, 2012; CHOI *et al.*, 2013; BANERJEE *et al.*, 2016; ARAÚJO *et al.*, 2017; HU & LUO, 2018).

Para melhorar a solubilidade e a biodisponibilidade do ITZ pela via oral, Choi *et al.* (2012) produziram microemulsões sólidas, contendo ITZ a 1%. As imagens de MEV mostraram glóbulos com superfície rugosa, sugerindo que o ITZ pode ser ligado e disperso na superfície do carreador sólido, o que pode permitir maior liberação e absorção. As análises de difração de raios X mostraram que o ITZ no estado amorfo apresenta um padrão de dissolução mais elevado em comparação com o ITZ cristalino. Estudos *in vivo* em ratos com ITZ oral (15 mg/kg) mostraram que parâmetros como AUC e  $C_{max}$  aumentaram aproximadamente 8,28 e 10,26 vezes, respectivamente, enquanto o  $T_{max}$  diminuiu aproximadamente 1,23 vezes em comparação à administração oral do pó cristalino de ITZ ( $p < 0,05$ ).

### 2.3.3 Sistemas de entrega nanoparticulados

Os sistemas de entrega nanoparticulados têm o potencial de liberação controlada e de melhorar a biodisponibilidade de fármacos através do aumento de sua superfície de contato (VERMA *et al.*, 2009; MERISKO-LIVERSIDE e LIVERSIDGE, 2003; 2008; JOG & BURGESS, 2017). Durante a produção destes sistemas, o fármaco pode ser amorfizado para melhorar a encapsulação nas nanopartículas. No entanto, as formas amorfas são mais instáveis e podem, com o tempo, converter-se à forma cristalina, sendo expelidas das nanopartículas, o que é um dos principais desafios dos sistemas nanoparticulados (CHIOU & RIEGELMAN, 1970; SERAJUDDIN, 1999; HANCOCK & PARKS, 2000; LEUNER & DRESSMAN, 2000; JOG & BURGESS, 2017).

Nanopartículas lipídicas são outra opção para melhorar a solubilidade e a biodisponibilidade de drogas lipofílicas; bem como promover uma liberação sustentada, uma vez que a matriz sólida diminui a mobilidade do fármaco

incorporado (MULLER *et al.*, 2000; FAHR e LIU, 2007; URBÁN-MORLÁN *et al.*, 2010). Zebb *et al.* (2017) desenvolveram carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) carregados com ITZ usando uma mistura binária de lipídios sólidos e líquidos. O CLN apresentou potencial Zeta de -30 mV, tamanho de partícula de aproximadamente 270 nm e 80% de eficiência de encapsulação (40 mg ITZ/mL). Os testes *in vitro* realizados em células de difusão de Franz com membranas de diálise mostraram uma liberação elevada nas primeiras 4 horas, e liberação sustentada por 23 horas, sendo o aumento da liberação proporcional ao aumento de lipídeo líquido no núcleo lipídico.

Mais recentemente, Passos *et al.*, (2020) desenvolveram CLN carregados com concentrações de ITZ entre 1 e 5%. Os CLN desenvolvidos apresentaram potencial Zeta negativo (-17,3 a -18,4 mV), tamanho de aproximadamente 225 nm e eficiência de encapsulação superior a 95%. Os ensaios conduzidos em células de difusão de Franz mostraram que os CLN diminuíram a perda de água transepidermica na pele intacta e ferida em 23 a 36% e melhoraram a retenção de ITZ na pele em comparação à uma suspensão aquosa de ITZ. Nos testes *in vivo* conduzido em larvas da espécie *Galleria mellonella* por meio do tratamento com CLN melhorou a taxa de sobrevivência de 80% para 100% após a infecção por *S. brasiliensis* na forma de levedura e de 30% para aproximadamente 100% após infecção por *C. albicans*.

Uma outra via que pode ser utilizada para a administração de CLN é a via pulmonar, propiciando a liberação de fármacos diretamente ao pulmão, tanto para o tratamento local ou sistêmico, devido à alta permeabilidade e grande área superficial dos pulmões (GRONEBERG & NICKOLAUS, 2001; GRONEBERG, 2003). Adicionalmente, na via pulmonar a atividade enzimática é comparativamente baixa, a absorção é mais rápida de fármacos e não há metabolismo de primeira passagem (PATIL & SARASIJA, 2012). No caso da administração pulmonar, características como tamanho das partículas, geometria e carga elétrica da superfície devem ser avaliadas (CHONO *et al.*, 2006; PATIL & SARASIJA, 2012).

Visando a veiculação do ITZ pela via pulmonar, Jafarinejad *et al.* (2012) desenvolveram nanopartículas de quitosana para produzir ITZ inalável. Na formulação proposta, 50 mg de ITZ foram dissolvidos em 25 mL de solução de

hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, seguido da adição dos demais excipientes. As nanopartículas obtidas apresentaram tamanhos de partículas variando entre 190 e 240 nm, e a maior eficiência de encapsulação foi de 55%. Nos ensaios de deposição pulmonar *in vitro*, realizados por meio da aplicação de um dispositivo de impinger de duplo estágio, o aumento significativo na porcentagem de dose emitida do fármaco aerossolizado a partir de pós contendo nanopartículas e leucina, em comparação com o pó obtido a partir de nanopartículas isoladas mostrou que a adição de leucina poderia melhorar a capacidade de fluidização dos pós compostos de nanopartículas durante o experimento *in vitro* realizado no artigo em questão. Segundo os autores, este resultado é provavelmente decorrente das forças de Van der Waals sob a superfície lisa das nanopartículas.

Em outro estudo, Bian *et al.* (2013) desenvolveram nanoesferas de poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) carregadas com 1% de ITZ. As nanoesferas produzidas apresentaram tamanho de aproximadamente 200 nm, potencial Zeta entre -20 e -30 mV, e eficiência de encapsulação de 72%. Os estudos *in vivo*, conduzidos em ratos machos adultos Sprague Dawley, mostraram que, após administração intravenosa, as nanopartículas proporcionaram nível plasmático sustentado superior a 100 ng/mL por até 24 horas, sendo a biodisponibilidade sistêmica semelhante à do Sporanox<sup>®</sup>.

Uma outra via utilizada para veiculação dos CLN é a via cerebral. A barreira hematoencefálica representa um grande obstáculo para a entrega de drogas para o cérebro, uma vez que impede a passagem da maioria dos compostos do sangue para o cérebro (DONG, 2018). Tendo-se o cérebro como tecido-alvo para entrega do fármaco, Lim *et al.* (2014) desenvolveram CLN carregados com ITZ (0,06%). Os CLN obtidos apresentaram tamanho médio entre 150 e 200 nm, potencial Zeta de - 18,7 mV e eficiência de encapsulação superior a 70%. Os estudos *in vitro*, realizados por meio de membrana de diálise, mostraram que a formulação proposta exibiu um perfil de liberação sustentada por até 24 horas. Nos ensaios *in vivo*, após administração por via intravenosa em ratos (veia caudal), os CLN propiciaram um pico de concentração no tecido cerebral superior a 500 ng/0,2 g de homogenato cerebral, sendo quase o dobro da concentração obtida com a formulação à base de ciclodextrina (250 ng/0,2 g).

### 2.3.4 Sistemas de entrega de fármacos autoemulsionantes (SEDDS)

Os SEDDS são misturas isotrópicas de óleos naturais, óleos sintéticos e surfactantes, sendo fisicamente mais estáveis e de fácil produção quando comparado às emulsões convencionais. No trato gastrointestinal, podem formar emulsões do tipo óleo/água ou microemulsões, com glóbulos entre 100 - 300 nm. Os SEDDS podem se espalhar pelo trato gastrointestinal, onde a motilidade digestiva do estômago e intestino atua proporcionando a agitação necessária para a autoemulsificação (SHAH *et al.*, 1994).

Em um estudo conduzido por Hong *et al.* (2006), um SEDDS carregado com 10% de ITZ resultou em glóbulos de aproximadamente 246 nm e melhor solubilização do ITZ quando comparado às cápsulas de Sporanox<sup>®</sup>, em um teste de dissolução. Adicionalmente, os estudos de biodisponibilidade em ratos, após a administração de 15 mg ITZ/kg, mostraram que a AUC e C<sub>max</sub> para os SEDDS foram 3,7 e 2,8 maiores do que as observadas para as cápsulas de Sporanox<sup>®</sup>.

### 2.3.5 Micelas poliméricas

As micelas poliméricas são estruturas de núcleo-casca automontadas formadas por copolímeros em bloco anfifílicos. Quando a concentração desses copolímeros atinge uma concentração superior à concentração micelar crítica, as partes hidrofóbicas dos copolímeros se organizam para minimizar o contato com as moléculas de água, formando uma estrutura vesicular na solução aquosa (JONES & LEROUX, 1999; RIESS, 2003). O aumento da biodisponibilidade de fármacos carregados em micelas poliméricas ocorre devido à proteção do fármaco no ambiente do trato gastrointestinal, a liberação controlada em locais-alvo e a inibição de bombas de efluxo (RIEUX *et al.*, 2006; XU *et al.*, 2013).

Jaiswal *et al.* (2015) desenvolveram micelas poliméricas de Pluronic<sup>®</sup>, carregadas com 70 a 82% de ITZ, para aplicações oculares. As micelas poliméricas apresentaram tamanho mínimo de 79,99 nm e eficiência de encapsulação superior a 90%. No teste de mucoadesão *in vitro*, conduzido com tecido de córnea excisado, as micelas propiciaram permanência desejável na área pré-córnea devido à maior força mucoadesiva. Na análise de atividade antifúngica *in vitro* utilizando o método de placa de copo de ágar e *Candida albicans*, as nanomicelas resultaram em zona

de inibição superior (18,65 mm) que a do colírio referência Itral® (14,42 mm). No teste de irritação em membrana corioalantóica de ovo de galinha as micelas foram levemente irritantes.

### 2.3.6 Cristal líquido

Os sistemas de cristal líquido são semelhantes aos sistemas coloidais de organismos vivos, sendo vantajosos sobre as formas farmacêuticas tradicionais no que diz respeito à estabilidade termodinâmica, propriedades bioadesivas e potencial de liberação controlada (CHAUDHARY *et al.*, 2019). Nesseem (2001) desenvolveu cristais líquidos carregados com 1% de ITZ. Os testes *in vitro* com *C. albicans* mostraram melhor atividade antimicótica (zona de inibição: 30,4 mm) em comparação com duas formulações padrão com a mesma concentração de ITZ: gel de hidroxietilcelulose (zona de inibição: 19,6 mm) e creme de monoestearato de glicerila (zona de inibição: 14,8 mm).

### 2.3.7 Aerossóis

Os aerossóis permitem a liberação de medicamentos pela via pulmonar de forma eficaz e por meio de técnicas não invasivas. Porém, durante o desenvolvimento dos aerossóis é necessário saber a quantidade do fármaco que de fato se deposita na região alvo do trato respiratório (CHENG, 2014). Duret *et al.* (2012) produziram um pó seco de ITZ para inalação e melhoraram a taxa de dissolução e solubilidade, além das propriedades de aerossolização. As dispersões sólidas de ITZ amorfo apresentaram 40 - 60% de partículas com diâmetros abaixo de 5,0 µm. O uso de manitol e tocoferol polietilenoglicol 1000 succinato melhorou a taxa de dissolução (de 50,4 min para 36,9 min) e a solubilidade (de 20 ng/mL a 46 ng/mL) da formulação em desenvolvimento.

### 2.3.8 Complexação com ciclodextrinas

As ciclodextrinas são estruturas com cavidades cujo tamanho é determinado pelo número de unidades da glicose. Apresentam características hidrofílicas devido à presença de hidroxilas, e hidrofóbicas devido aos átomos de oxigênio nas ligações glicosídicas e átomos de hidrogênio. A cavidade das ciclodextrinas permite a formação de complexos de inclusão e encapsulação de fármacos pouco solúveis,



aumentando sua solubilidade, dissolução e biodisponibilidade. Além disso, também pode ser observado aumento na estabilidade e tempo de vida do medicamento, evitando a interação com os componentes da formulação (GREGÓRIO, 2014; CONCEIÇÃO *et al.*, 2018; 2018; DAVIS & BREWSTER, 2004; SALÚSTIO 2011; CARNEIRO *et al.*, 2019). Comercialmente, as ciclodextrinas são utilizadas em formulações de suspensão oral e injeção intravenosa, por meio da dispersão do ITZ em um veículo aquoso, devido à formação de um complexo dinâmico (não covalente) com hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (PEETERS *et al.*, 2002; EL-BARGHOUTHI *et al.*, 2006). Contudo, é importante ressaltar que, em formulações parenterais, a utilização de ciclodextrinas pode ser um problema, uma vez que este excipiente pode acarretar problemas renais (UEKAMA *et al.*, 1998).

Em um estudo conduzido por Cevher *et al.* (2014) o ITZ foi complexado com hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, metil- $\beta$ -ciclodextrina e éter sulfobutil- $\beta$ -ciclodextrina para aumentar a solubilidade do fármaco em água e reduzir reações adversas. Dentre as três formulações, o complexo contendo éter sulfobutil- $\beta$ -ciclodextrina apresentou maior taxa de complexação e atividade antifúngica contra *C. albicans*, em testes de microdiluição em caldo. Os comprimidos vaginais bioadesivos produzidos com éter sulfobutil- $\beta$ -ciclodextrina aumentaram o tempo de permanência do ITZ na vagina, sendo esses resultados obtidos por meio de testes em mucosa vaginal de uma vaca recém-excisada.

Em outro estudo, Francois *et al.* (2003) utilizaram hidroxipropil-ciclodextrina para produzir um creme contendo 2% de ITZ. Testes realizados em coelhos mostraram segurança em parâmetros como irritação (quando comparado ao grupo que recebeu formulação placebo) e toxicidade (quando comparado aos grupos que receberam um creme placebo e ao grupo controle não tratado), além da não ocorrência de absorção sistêmica. Durante a avaliação em mulheres, o creme mostrou eficácia na diminuição ou eliminação da candidíase, com poucos efeitos colaterais.

### 2.3.9 Pós

Os pós podem ser descritos como uma fina massa seca em estado sólido, composta por diferentes formas de partículas, tamanhos e propriedades de fluxo.

Apesar das propriedades desejáveis, apresentam limitações de fabricação, como a dificuldade de escoamento e aglomeração. Os pós têm diferentes classificações e usos de acordo com a via de administração (ALI *et al.*, 2019). Duret *et al.* (2014) produziram três pós secos de ITZ para inalação em solução de manitol: suspensão de ITZ (F1), solução de ITZ (F2) e ITZ com fosfolipídio (F3). Os resultados obtidos mostraram que o ITZ era cristalino em F1 e amorfo nas formulações F2 e F3. Nas formulações F2 e F3 foi observada uma solução supersaturada de ITZ, com uma solubilidade máxima de  $450 \pm 124$  ng/mL (F2) e  $498 \pm 44$  ng/mL (F3). Esses pós foram inflados endotraquealmente em camundongos com uma dose única de 0,5 mg/g e as concentrações pulmonares de ITZ 24 h após a administração pulmonar das formulações F1 e F2 permaneceram acima das concentrações inibitórias mínimas para *Aspergillus fumigatus* (2 µg/g de pulmão).

Karashima *et al.* (2017) produziram pós cristalinos micronizados e formulações amorfas secas de ITZ com ácido succínico ou ácido l-tartárico, as quais apresentaram tamanho entre 1,4 e 1,9 µm. No estudo *in vivo* conduzido em ratos, os pós cristalinos micronizados de ITZ mostraram uma melhor taxa de dissolução intrínseca e perfil de absorção pulmonar que a formulação amorfa seca por pulverização e ITZ cristalino. Adicionalmente, após a administração pulmonar em ratos, os co-cristais micronizados apresentaram área sob a curva 19-24 vezes maior que a observada para o ITZ cristalino, que foi 1,6-2,0 vezes maior que os valores observados para o ITZ amorfo. O ITZ amorfo mostrou-se fisicamente instável, havendo rápida cristalização do ITZ ao longo do estudo.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Desenvolver, caracterizar e avaliar a eficácia de uma suspensão injetável de ITZ para tratamento da esporotricose felina.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Realizar o levantamento bibliográfico de diferentes excipientes aprovados para uso parenteral na medicina veterinária para serem avaliados no desenvolvimento das suspensões de ITZ;
- Desenvolver suspensões injetáveis de ITZ;
- Desenvolver um método analítico para quantificação do ITZ na formulação;
- Caracterizar físico-quimicamente as suspensões desenvolvidas quanto ao pH, comportamento reológico, osmolaridade, aspecto macro e microscópica e teor de ITZ;
- Definir o método mais adequado para esterilização das suspensões de ITZ;
- Avaliar a eficácia da suspensão selecionada em felinos com esporotricose.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material

O ITZ (Aktinos Pharma, Hyderabad, Índia) foi gentilmente fornecido pela Hipolabor Farmacêutica Ltda (Belo Horizonte, Brasil). O álcool benzílico e o ácido cítrico grau farmacêutico foram fornecidos pela Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha). O triglicerídeo caprílico/cáprico (Crodamol™ GTCC Pharma), ácido oleico (*Super Refined™ Oleic Acid*), óleo de rícino polioxil 35 purificado (*Super Refined™ P35 Castor Oil*), óleo de rícino (*Super Refined™ Castor Oil*), óleo de soja (*Super Refined™ Soybean Oil*), polietilenoglicol 400 (*Super Refined™ PEG 400*) e o óleo de sésamo (*Super Refined™ Sesame Oil*), foram gentilmente doados pela Croda International Plc (Sanith, Reino Unido). O poli(1-vinil-2-pirrolidona) (Kollidon® 17 PF), polioxil 15-hidroxiestearato (Kolliphor® HS15), poloxamer 188 (Kolliphor® P 188 Geismar) e o poloxamer 407 (Kolliphor® P 407) foram gentilmente doados pela Basf (Ludwigshafen, Alemanha). O éter monoetílico de dietilenoglicol (Transcutol® HP) e o oleoil polioxil-6 glicerídeos (Labrafil® M 1944) foram gentilmente doados pela Gattefossé (Lyon, França), através da MCassab (São Paulo, Brasil). As vitaminas E acetato oleosas foram gentilmente cedidas pela RJR Nutrientes e Farmoquímicos (Osasco, Brasil) e pela Biovital (São Carlos, Brasil) através do grupo Citopharma® (Belo Horizonte, Brasil).

Para a avaliação da sensibilidade de cepas de *Sporothrix brasiliensis*, o meio ágar Sabouraud dextrose (SDA) e as microplacas de 96 poços foram adquiridos da KASVI (São José dos Pinhais, Brasil). O meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) - 1640 Gibco® foi adquirido da Thermo Fisher Scientific (Waltham, EUA). Foram utilizados três isolados da forma filamentosa do fungo *Sporothrix brasiliensis*, os quais eram oriundos de casos clínicos de gatos com esporotricose em Belo Horizonte e região metropolitana, obtidos a partir do banco de amostras do Laboratório de Micologia e Micotoxinas da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (LAMICO EV/UFMG).

Para o desenvolvimento do método analítico, foi utilizado como padrão primário o ITZ obtido da USP – *United State Pharmacopeia* (Itraconazole USP RS, pureza: 99,7%, lote R118F0, Catalog No: 1354251, CAS No: 84625-61-6, EUA), com

validade vigente no período de realização das análises. Posteriormente, foi utilizado um padrão secundário de trabalho, o qual foi obtido a partir do ITZ proveniente do fabricante Aktinos Pharma Pvt Ltd (Andhra Pradesh, Índia), lote ITC004318. O metanol e a acetonitrila grau CLAE foram obtidos da MERCK KGaA (Darmstadt, Alemanha). Já o tetrahidrofurano grau CLAE foi adquirido da Sigma-Aldrich (Missouri, EUA). Já o fosfato de amônio monobásico foi obtido da J.T. Baker (Xalostoc, México). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

## **4.2 Métodos**

### *4.2.1 Estudos de pré-formulação*

#### 4.2.1.1 Seleção dos excipientes grau farmacêutico

Inicialmente, foi realizado um levantamento na literatura científica para obter informações como a solubilidade do ITZ em diferentes excipientes grau farmacêutico autorizados para administração parenteral, bem como a forma como esses excipientes eram incorporados para produção das formulações e a compatibilidade excipiente-excipiente e excipiente-fármaco. As pesquisas foram realizadas principalmente nas bases de dados PubMed e no Portal de Periódicos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), com pesquisas adicionais feitas por meio de ferramentas de pesquisa, como Google e Google Scholar. Todas as pesquisas foram conduzidas sem restrição de idiomas ou períodos.

#### 4.2.1.2 Avaliação da solubilidade do ITZ nos excipientes selecionados

Por motivo de confidencialidade da tecnologia que se encontra em desenvolvimento para futuro patenteamento, a matéria sensível não será revelada e será citada por meio de códigos que serão utilizados ao longo do trabalho. Após a seleção dos excipientes mais promissores, foi realizada a avaliação da solubilidade do ITZ, conforme descrito na Farmacopeia Brasileira, 6ª edição (2019) (**Tabela 1**). Para condução do teste de solubilidade, o volume/massa de fármaco e excipientes foram adaptados para minimizar o consumo dos materiais. Assim, 10 mg de ITZ foram pesados em balança analítica (Shimadzu AUY220, Brasil) e, após a adição de volumes crescentes dos solventes, foi realizada a homogeneização durante 1

minuto em banho ultrassônico (Branson 2510R-DTH, Brasil). A avaliação da solubilidade foi conduzida à temperatura ambiente ( $25 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Ao final da avaliação, quando a solução se apresentava límpida, uma gota da mesma foi submetida à análise em microscópio de luz polarizada, conforme método descrito no item 4.2.2.3, a fim de se confirmar a completa solubilização do ITZ.

**Tabela 1:** Tabela de termos descritivos de solubilidade.

<b>Termo descritivo</b>	<b>Volume aproximado de solvente por grama de substância</b>	<b>Volume aproximado de solvente por 10 miligramas de substância (adaptação da Farmacopeia Brasileira, 6ª edição)</b>
Muito solúvel	Menos de 1 mL*	Menos de 0,01 mL
Facilmente solúvel	De 1 a 10 mL*	De 0,01 a 0,1 mL
Solúvel	De 10 a 30 mL*	De 0,1 mL a 0,3 mL
Moderadamente solúvel	De 30 a 100 mL*	De 0,3 mL a 1 mL
Pouco solúvel	De 100 a 1000 mL*	De 1 mL a 10 mL
Muito pouco solúvel	De 1000 a 10000 mL*	De 10 mL a 100 mL
Praticamente insolúvel ou insolúvel	Mais de 10000 mL*	Mais de 100 mL

\*Fonte: Farmacopeia Brasileira, 6ª edição (2019).

#### 4.2.1.3 Definição do perfil alvo do produto

A forma farmacêutica escolhida para o desenvolvimento da formulação proposta foi uma suspensão aquosa injetável, devido à baixa solubilidade do ITZ em água. Adicionalmente, uma suspensão injetável pode permitir a liberação controlada do fármaco (KALYANI *et al.*, 2013), o que é desejado no tratamento da esporotricose.

A concentração de ITZ escolhida foi de 10 mg/mL de formulação, tendo-se inicialmente como base as doses terapêuticas descritas em trabalhos disponíveis na literatura científica (MADRID *et al.*, 2010; LLORET *et al.*, 2013; ROSSI *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2018). É válido ressaltar que a dose de 10 mg de ITZ/mL da formulação foi mantida frente aos resultados referentes, principalmente, aos resultados obtidos nos estudos de solubilidade e estabilidade ao longo do processo desenvolvimento das formulações.

A via subcutânea foi selecionada porque, em felinos, a mais grave das consequências adversas da administração parenteral é a ocorrência de sarcomas

invasivos (principalmente fibrossarcomas), os chamados “sarcomas no local de injeção em felinos”. Portanto, para prevenir reações inflamatórias nos locais de injeção, a via subcutânea é preferida quando comparada à via intramuscular, uma vez que tumores intramusculares se desenvolvem com frequência semelhante à da via subcutânea, mas são mais difíceis de se detectar precocemente (HARTMANN *et al.*, 2015). O volume de injeção de 1-2 mL de formulação (10-20 mg de ITZ) foi selecionado porque esse volume é compatível com a via subcutânea, assim como o fármaco e excipientes utilizados na formulação (VERTEBRATE ANIMAL RESEARCH, 2020).

#### 4.2.1.4 Desenvolvimento das formulações

Durante o desenvolvimento das formulações, inicialmente, o ITZ era pesado e solubilizado em X1, seguido de 5 minutos (250 rpm/min) de agitação magnética (Ika Color Squid, China). Posteriormente, eram adicionados os demais excipientes, seguidos de mais 5 minutos ou mais de agitação magnética após a adição de cada excipiente, sendo X17 o último excipiente adicionado. Finalizada a produção, o pH da formulação era avaliado e adequado à faixa de 2,5 a 4,5, se necessário. Optou-se por trabalhar com uma faixa de pH mais ácida, por ser compatível com a via de administração escolhida e propiciar uma melhor solubilização do ITZ (PRENTICE & GLASMACHER, 2005; HUANG, 2021). O ajuste do pH, quando necessário, era sempre realizado com solução de X18 no excipiente X17.

#### *4.2.2 Caracterização das formulações*

##### 4.2.2.1 Aspecto visual

As formulações eram avaliadas macroscopicamente logo após a produção e ao longo do tempo, sendo obtidos registros fotográficos. Os parâmetros observados eram: formação de agregados de partículas com maior tamanho, capacidade de ressuspensão das partículas, alteração da coloração da formulação, separação de fases e alteração da viscosidade.

##### 4.2.2.2 Osmolaridade

###### 4.2.2.2.1 Cálculo teórico

A osmolaridade das formulações desenvolvidas também foi avaliada, posto ser este um parâmetro importante para formulações parenterais. Assim, inicialmente, era calculado o equivalente grama da substância em relação ao cloreto de sódio (E), conforme apresentado na equação abaixo:

$$E = \frac{PM \text{ NaCl} \times i \text{ da substância}}{i \text{ NaCl} \quad PM \text{ substância}}$$

Onde “E” corresponde ao equivalente em cloreto de sódio, “i” é a constante de ionização da molécula e PM o peso molecular. Em seguida, relacionávamos o equivalente em cloreto de sódio à concentração da substância na formulação e verificávamos qual a quantidade de cloreto de sódio representada pela substância na formulação. Assim, verificávamos a osmolaridade calculada, tendo em vista que uma solução isoosmótica contém 0,009 g de NaCl/mL:

$$\text{Osmolaridade} = 0,009 \text{ g/mL NaCl} - [\text{Eq. cloreto de sódio (E)} \times \frac{\text{concentração substância(g) na formulação/mL}}{\text{concentração NaCl/mL}}]$$

#### 4.2.2.2.2 Avaliação da osmolaridade por osmômetro crioscópico

A osmolaridade das suspensões foi avaliada em um osmômetro crioscópico (Osmomat 030, Gonotec, Alemanha), por meio da adição da amostra (60 µL) no equipamento, sendo a amostra em questão resfriada com um sistema de resfriamento, enquanto a sua temperatura era monitorada eletronicamente. A osmolaridade total de soluções aquosas é determinada por medições comparativas dos pontos de congelamento da água pura e das soluções em análise (GONOTEC, 2009).

#### 4.2.2.3 Microscopia de luz polarizada

A avaliação da presença de cristais de ITZ nas formulações foi realizada por meio de microscopia óptica de luz polarizada, utilizando um microscópio óptico com polarização da luz (Zeiss Axio Imager M2, Alemanha) equipado com câmera digital Axio Cam Model ERc 5S (Carl Zeiss Microscopy S.L., Alemanha). Para a avaliação, uma gota das amostras foi adicionada, sem diluição prévia, diretamente sobre uma lâmina de vidro, sendo cobertas com lamínula e posteriormente avaliadas sob



aumento de 200x utilizando-se o *software* ZEN Lite 2012® (Carl Zeiss Microscopy S.L., Alemanha), com visualização da formulação em campo claro e em campo escuro.

Para identificação da morfologia dos cristais de ITZ, foi produzida uma suspensão de ITZ em água (1 mg/mL). Esta suspensão foi utilizada como controle positivo para identificação da presença de cristais de ITZ nas formulações.

#### 4.2.2.4 pH

O pH das formulações foi avaliado utilizando um medidor de pH mPA-210 (MS Tecnopon®, Brasil). Antes de cada avaliação, era realizada a calibração do equipamento em soluções tampão pH 4,00 e pH 7,00.

#### 4.2.2.5 Avaliação da viscosidade

A avaliação da viscosidade foi conduzida em viscosímetro rotacional Brookfield, modelo DV III (Ametek Brookfield, Middleborough, EUA). Para a avaliação, 0,5 mL de amostra das formulações foram colocadas no copo de amostragem e a leitura foi obtida utilizando *spindle* CP40. Os dados referentes à reologia foram obtidos de forma ascendente e descendente avaliando a viscosidade (cP) *versus* taxa de cisalhamento (1/sec). As análises foram conduzidas em temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C ± 2,5).

#### 4.2.2.6 Tamanho de partícula

Para avaliar o tamanho das partículas da formulação produzida e de seu respectivo placebo, foi utilizado o equipamento MasterSize, modelo Hydro LV (Altmann AS, Malvern Produtos, Brazil). Para execução dos testes, inicialmente, foi feita a análise com água pura, sendo avaliados depois o placebo e a formulação, a fim de se observar a distribuição dos tamanhos das partículas presentes em cada amostra avaliada, sendo os resultados de densidade de volume (%) obtidos em função das classes de tamanho (µm).

### *4.2.3 Esterilização*

#### 4.2.3.1 Calor úmido

Após o envase em ampolas de vidro borosilicato tipo I, as formulações desenvolvidas foram submetidas à esterilização por calor úmido. A esterilização foi realizada em uma autoclave AHMC Sercon 21 L (São Paulo, Brasil). Durante a padronização, foram avaliados dois tipos de ciclos: 100 °C durante 20 minutos e 127 °C durante 5 minutos.

#### 4.3.3.2 Radiação gama

Como segunda estratégia para esterilização das formulações, também avaliamos a esterilização por radiação gama das ampolas com as formulações desenvolvidas. A esterilização foi realizada por meio de uma parceria com o Laboratório de Irradiação Gama (LIG) do Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear (CDTN). O sistema utilizado é classificado como Irradiador Panorâmico Múltipropósito de Categoria II (Modelo/número de série IR-214, tipo GB-127 - MDS Nordion, Canadá, EUA), equipado com uma fonte de Cobalto-60 estocada a seco com atividade máxima de 2.200 TBq ou 60.000 Ci (CDTN, 2020). A esterilização das ampolas contendo as formulações foi realizada por meio da exposição a uma carga de 15 KGy de radiação gama.

#### *4.2.4 Determinação da sensibilidade dos isolados de *Sporothrix brasiliensis* pelo método de concentração inibitória mínima*

##### 4.2.4.1 Isolados de *Sporothrix brasiliensis*

Para a determinação da sensibilidade de cepas de *Sporothrix spp.*, foram selecionadas três cepas de *Sporothrix brasiliensis*, que é o principal agente etiológico da esporotricose em felinos no Brasil (GREMIÃO *et al.*, 2020). O presente estudo foi conduzido com a forma filamentosa do fungo, conforme preconizado no método de referência M38-A2 (CLSI, 2012). Os isolados foram codificados como N481.21, N485.21 e N488.21; e as placas identificadas como S3, S7 e S10, respectivamente.

##### 4.2.4.2 Preparo das soluções

As substâncias avaliadas no teste de concentração inibitória mínima foram o ITZ e o X1, que são respectivamente o IFA e o principal solvente do ITZ utilizado no desenvolvimento das formulações. Para o preparo da solução contendo ITZ, com

o auxílio de uma balança analítica (Shimadzu AY220, Brasil), pesou-se 12,2 mg do fármaco em um béquer. O ITZ pesado foi solubilizado em 5 mL de DMSO e a solução obtida transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 10,00 mL, sendo o volume completado com DMSO, resultando em uma solução de aproximadamente 1,22 mg de ITZ/mL. Com o auxílio de uma micropipeta monocal de 1000 µL, 160 µL dessa solução foram transferidos para um tubo Falcon de 20 mL, sendo acrescentados 4,84 mL de meio RPMI 1640 para obtenção de uma solução de 39,04 µg de ITZ/mL.

Para o preparo das soluções de X1, com o auxílio de uma balança analítica (Shimadzu AY220, Brasil), pesou-se 11,1 mg de X1 em um balão volumétrico de 10,00 mL. Na sequência, foi adicionado o DMSO, a fim de se obter uma solução de 1,11 mg/mL. Com o auxílio de um pipetador motorizado tipo AID de 100 mL, 1,280 mL da solução acima foi transferida para um tubo Falcon de 20 mL e acrescentada de 3,72 mL de meio RPMI 1640, formando uma solução de concentração igual a 284,16µg de X1/mL.

#### 4.2.4.3 Preparo do inóculo filamentososo

Para a obtenção do fungo na forma filamentososa, os isolados foram cultivados separadamente em meio Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) (KASVI, Brasil) e incubados em estufa com circulação de ar a 25°C por 7 dias. As placas com as colônias filamentosas foram inicialmente lavadas com 1 mL de solução salina estéril (0,85%) contendo 0,1% de Tween 20®. Após este processo, a suspensão contendo conídios e fragmentos de hifas foi transferida para um tubo de ensaio vazio estéril, onde permaneceu por 3 a 5 minutos para que ocorresse a decantação dos fragmentos de hifas. Na sequência, o sobrenadante contendo os conídios foi transferido para um tubo de ensaio vazio estéril e homogeneizado em vórtex por 15 segundos.

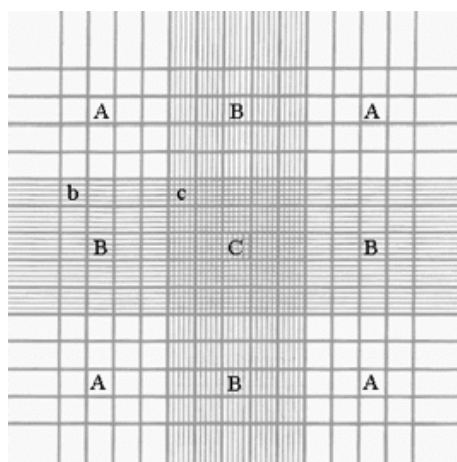
Uma gota da suspensão foi, então, colocada entre a lamínula e a câmara de Neubauer e levada ao microscópio óptico para contagem dos esporos nos quadrantes A, que apresentava volume de 0,1 mm<sup>3</sup> (**Figura 7**).

A concentração da suspensão de esporos a ser plaqueada estaria adequada se fossem contados de 4 a 10 esporos por quadrante, totalizando uma suspensão de

4 a  $10 \times 10^4$  esporos/mL. Caso fosse encontrada uma concentração menor, procedia-se uma nova lavagem da placa com solução salina estéril (0,85%) contendo 0,1% de Tween 20®, a fim de se remover mais esporos e, caso a concentração fosse maior, era diluída com a mesma solução salina contendo Tween 20®.

Após ajuste da concentração de esporos na câmara de Neubauer, foi realizada a diluição da suspensão em meio RPMI 1640 tamponado e acrescido de glicose na proporção de 1:50 tamponado com tampão MOPS, resultando em uma suspensão duas vezes mais concentrada que o inóculo final, visto que para o teste, em cada poço da placa seriam adicionadas as soluções com as substâncias a serem avaliadas na proporção 1:1 (100 µL solução da substância + 100 µL solução do inóculo).

**Figura 7:** Esquema da câmara de Neubauer com respectivos quadrantes indicados pelas letras A, B e C.



#### 4.2.4.4 Preparo da placa para microdiluição

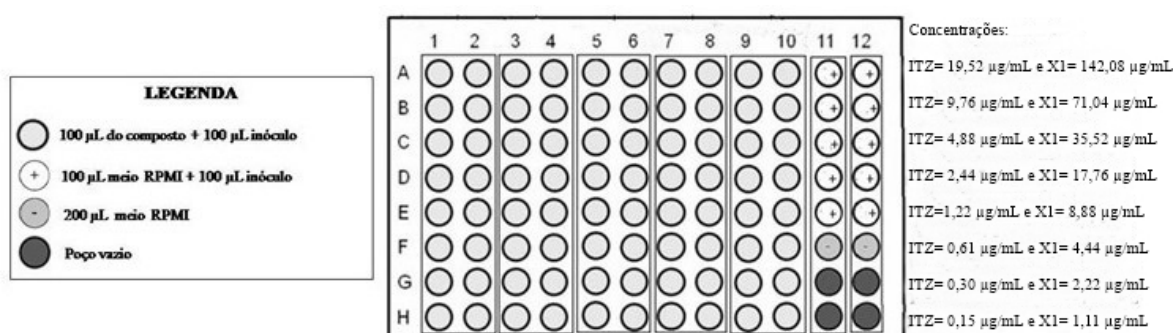
Os estudos de microdiluição foram realizados, em duplicata, em placas estéreis de 96 poços de fundo em formato de U (Kasvi, Brasil), distribuídos em oito fileiras horizontais (A-H) e doze colunas verticais (1-12).

Para cada composto foram avaliadas oito concentrações. Alíquotas de 100 µL de meio líquido RPMI 1640 tamponado e acrescido de glicose foram adicionadas nos poços das fileiras B-H, nas colunas 1-10 com uma pipeta multicanal. Em seguida,

200  $\mu\text{L}$  das soluções dos compostos, que apresentavam o dobro da concentração mais alta, foram adicionados aos poços na fileira A (1-10). Deste modo, os poços 1-10 da fileira A ficaram com um volume de 200  $\mu\text{L}$ .

Com o auxílio de uma pipeta automática, realizou-se então diluições seriadas, passando 100  $\mu\text{L}$  de uma fileira para outra, começando dos poços da fileira A para o poço subsequente até a fileira H, desprezando-se ao final os 100  $\mu\text{L}$  restantes. Em seguida, foram adicionados os inóculos, havendo ainda a presença do controle dos inóculos (100  $\mu\text{L}$  de meio RPMI 1640 tamponado e acrescido de glicose e 100  $\mu\text{L}$  do inóculo) e controle de esterilidade do meio (200  $\mu\text{L}$  de meio RPMI 1640 tamponado e acrescido de glicose) nas placas em questão. A representação esquemática das placas do estudo está ilustrada na **Figura 8**.

**Figura 8:** Representação esquemática da placa de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em cepas de *S. brasiliensis*.



#### 4.2.4.5 Armazenamento das placas e leitura do teste

As placas obtidas nas etapas anteriormente descritas foram incubadas em estufa com circulação de ar a 35°C e a leitura foi realizada após 72 horas de incubação. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada visualmente (inspeção visual no fundo da placa), sendo considerada como a menor concentração do composto capaz de inibir o crescimento fúngico. Para interpretação dos resultados, foi feita a comparação do crescimento em cada poço com o crescimento observado no poço do controle do inóculo.

#### 4.2.5 Desenvolvimento do método analítico para determinação de impurezas e teor do ITZ por CLAE

##### 4.2.5.1 Considerações iniciais

De acordo com especificações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2017), durante o desenvolvimento de um método analítico indicativo de estabilidade, é necessário determinar os limites: das impurezas, sendo que toda impureza que ultrapasse o limite de notificação deve ser incluída no cálculo de impurezas totais; de identificação, visto que toda impureza que ultrapasse o limite de identificação deve, em princípio, ser identificada e especificada; de quantificação, posto que toda impureza que ultrapasse o limite de quantificação deve ser qualificada frente a informação da dose máxima de ITZ. Assim, nesta etapa, extraímos os limites regulatórios no site <https://coifa.anvisa.gov.br/calculos.html>, estabelecendo como dose máxima de ITZ a dose especificada na bula do ITZ cápsula para administração oral (dose máxima diária: 400 mg), uma vez que não há no mercado uma formulação injetável de ITZ para administração subcutânea ou intramuscular, por exemplo.

Como não há um método farmacopeico para formulações injetáveis de ITZ, o método selecionado como referência foi o de cápsulas de ITZ, disponível na USP-NF (2019). Para a avaliação das impurezas conhecidas e desconhecidas, o valor estabelecido foi de  $\leq 0,2\%$  e o limite de notificação até  $0,1\%$ . Já para o teor, a faixa permitida deve se encontrar entre 90 e 110% do valor rotulado. As condições cromatográficas utilizadas nas análises estão especificadas na **Tabela 2**. O *software* Waters Empower™ 3 foi utilizado para controlar e processar os resultados obtidos.

**Tabela 2:** Condições cromatográficas do método analítico para determinação do teor do itraconazol e quantificação de impurezas na formulação **GT64**.

Parâmetro	Especificação
Equipamento	Thermo Fischer (UltiMate™ 3000)
Coluna cromatográfica	C18 3 $\mu$ m 120Å 4,6 x 150 mm (Acclaim™ 120)
Pré coluna	C18 4 x 3.0 mm ID (Phenomenex)
Eluição	Gradiente
Fluxo	1,5 mL/min
Volume de injeção	10 $\mu$ L
Temperatura da coluna	30 °C (método inicial) e 20 °C (método otimizado)
Comprimento de onda de detecção	225 (método inicial) e 259 nm (método otimizado)

**Tabela 2:** Condições cromatográficas do método analítico para determinação do teor do itraconazol e quantificação de impurezas na formulação **GT64** (continuação).

<b>Parâmetro</b>	<b>Especificação</b>
Tempo de Corrida	50 minutos (método inicial), posteriormente, o método foi otimizado, sendo o tempo de corrida de 55 minutos.

#### 4.2.5.2 Preparo das soluções para a determinação de impurezas e teor de ITZ por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

##### 4.2.5.2.1 Preparo da fase móvel

A fase móvel foi constituída de 2 fases. A fase A foi preparada por meio da mistura de 1800 mL da solução tampão (1,16 g de fosfato de amônio monobásico em 1000 mL de água ultrapurificada, seguido do ajuste do pH para 2,0, por meio da utilização de ácido fosfórico) e 200 mL de acetonitrila grau CLAE. Já a fase B foi preparada por meio da mistura de 900 mL da solução tampão e 1100 mL de acetonitrila grau CLAE. Ambas as fases foram filtradas em membranas filtrantes Durapore PVDF 0,45 µm e degaseificadas durante 10 minutos em banho de ultrassom (Branson 8510, Brasil).

##### 4.2.5.2.2 Preparo do diluente

O diluente foi constituído de uma mistura de 500 mL de metanol e 500 mL de tetrahidrofurano, seguida da filtração em filtro membranas filtrantes Durapore PVDF 0,22 µm.

##### 4.2.5.2.3 Preparo solução padrão 1

O preparo do padrão primário foi feito por meio da pesagem de 10 mg de ITZ, seguido de transferência para balão volumétrico de 10 mL, adição de 5 mL de solução diluente e homogeneização durante 10 minutos em banho de ultrassom. Na sequência, o volume foi completado com a solução diluente e homogeneizado manualmente (Concentração: 1000 µg de ITZ/mL). A **solução padrão 1** foi obtida em duplicata.

##### 4.2.5.2.4 Preparo solução padrão 2

Utilizando uma pipeta automática de 1,00 mL, transferiu-se quantitativamente 1,00 mL da **solução padrão 1** para um balão volumétrico de 10 mL. Em seguida, o volume foi

completado com a solução diluente e a solução foi homogeneizada manualmente (Concentração: 100 µg de ITZ/mL). A **solução padrão 2** foi obtida em duplicata.

#### 4.2.5.2.5 Preparo solução padrão 3

Utilizando uma pipeta automática de 1,00 mL, transferiu-se quantitativamente 0,50 mL da **solução padrão 2** para um balão volumétrico de 10 mL. Em seguida, o volume foi completado com a solução diluente e a solução foi homogeneizada manualmente (Concentração: 5 µg de ITZ/mL). A **solução padrão 3** foi obtida em duplicata.

#### 4.2.5.2.6 Preparo solução amostra 1

Frente ao pequeno volume de formulação disponível durante o estudo, optou-se por trabalhar com volumes menores, mas respeitando a concentração final almejada (2,5 mg de ITZ/mL para a avaliação de impurezas e 100 µg de ITZ/mL para a avaliação do teor). Assim, utilizando uma pipeta automática de 1,00 mL, transferiu-se 0,4 mL da formulação e respectivo placebo para vials independentes, sendo dois vials para a formulação (denominados **GT64.1** e **GT64.2**) e um para o placebo. Os volumes foram completados para 1,6 mL com solução diluente (Concentração: 2,5 mg de ITZ/mL).

#### 4.2.5.2.7 Preparo solução amostra 2

Utilizando uma pipeta automática de 100 µL, transferiu-se 40 µL de cada uma das **soluções amostra 1** (**GT64.1**, **GT64.2** e placebo) para 3 vials independentes e os volumes foram completados para 1 mL com diluente Metanol:Tetrahydrofurano (50:50), obtendo-se a concentração final correspondente a 100 µg de ITZ/mL.

### 4.2.5.3 Desenvolvimento do método analítico para determinação de impurezas e do teor de ITZ na formulação teste por CLAE

#### 4.2.5.3.1 Determinação da densidade da formulação

A densidade da formulação escolhida (1% ITZ p/p) foi avaliada por meio da pesagem de 3 vials vazios e da pesagem destes vials após adição de 1 mL de formulação. A densidade foi calculada por meio da diferença entre as massas dos vials (vazios e com formulação), sendo o resultado médio obtido igual a  $1.00729 \pm 0,0033$  g/mL. Como a densidade estava muito próxima de 1 g/mL, adotou-se então essa densidade para cálculos posteriores.



#### 4.2.5.3.2 Degradação forçada

Os testes de degradação forçada permitem a obtenção de produtos de degradação através da exposição do IFA e da formulação a condições de estresse, como luz, calor, umidade, hidrólise ácida/ básica, oxidação e íons (ANVISA, 2019). Este estudo é realizado para o desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade com especificidade e seletividade adequadas; e para fornecer informações acerca das possíveis rotas de degradação do IFA/formulação (ANVISA, 2015; ANVISA 2017). Após levantamentos na legislação vigente, as condições de estresse avaliadas foram as de exposição ao ácido, base, íons, peróxido, luz e calor. Para realização dos testes de degradação forçada, inicialmente, foi avaliada a solubilidade do IFA (concentração de 10 mg/mL) em acetonitrila, DMSO e metanol. A solubilidade em água não foi avaliada, pois o ITZ é praticamente insolúvel em água. Nos solventes avaliados, o IFA foi mais solúvel em DMSO, sendo este o solvente selecionado para condução dos estudos.

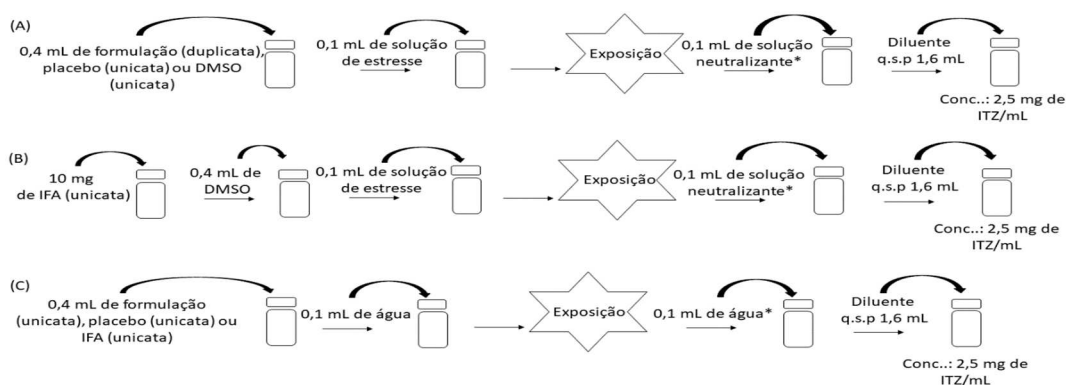
Para a avaliação do decaimento (degradação), os testes de estresse correspondentes aos tempos de 24 e 168h foram conduzidos da seguinte forma (**Figura 9**):

- Degradação da formulação, placebo ou DMSO (branco): adicionou-se 0,4 mL da formulação (duplicata: **GT64.1** e **GT64.2**), do placebo (unicata) e do branco (unicata) a vials independentes, seguida da adição de 0,1 mL de solução correspondente às condições de estresse ácido (HCl 1 e 0,1 M), básico (NaOH 1 e 0,1 M), oxidação (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% e 0,3%) e íons (FeCl<sub>3</sub> 5 mM). Para a avaliação nas condições de estresse de calor (60 °C) e luz UV, 0,4 mL da formulação (duplicata: **GT64.1** e **GT64.2**), do placebo (unicata) e do branco (unicata) foram transferidos para vials independentes, seguido da exposição às condições de estresse. Para todas as condições de estresse avaliadas, decorrido o tempo pré-determinado (168h ou 24h), adicionou-se 0,1 mL do agente neutralizante (para os estresses ácido e básico), seguida da adição da solução diluente para um volume q.s.p 1,6 mL, obtendo-se uma concentração final de 2,5 mg de ITZ/mL.
- Degradação do IFA: 10 mg do IFA foi solubilizado em 0,4 mL de DMSO, em unicata, seguida da adição de 0,1 mL de solução correspondente às condições de

estresse ácido (HCl 1 e 0,1 M), básico (NaOH 1 e 0,1 M), oxidação (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% e 0,3%) e íons (FeCl<sub>3</sub> 5 mM). Para a avaliação nas condições de estresse de calor (60 °C) e luz UV, 0,4 mL da formulação (em duplicata: **GT64.1** e **GT64.2**), do placebo (unicata) e do branco (unicata) foram transferidos para vials independentes, seguido da exposição às condições de estresse em questão. Para todas as condições avaliadas, decorrido o tempo pré-determinado (168h ou 24h), adicionou-se 0,1 mL do agente neutralizante (no caso dos testes de estresse ácido e básico), seguido da adição da solução diluente para um volume q.s.p 1,6 mL, obtendo-se uma concentração final de 2,5 mg de ITZ/mL.

- Degradação da solução controle: foi realizada por meio da transferência de 0,4 mL da formulação (unicata), placebo (unicata) ou IFA (unicata), seguida da adição de 0,1 mL de água (ao invés da adição de soluções correspondentes às condições de estresse). Decorrido o tempo pré-determinado (168h ou 24h), adicionou-se 0,1 mL de água (no caso dos controles correspondentes aos testes de estresse ácido e básico), seguida da adição da solução diluente para um volume q.s.p 1,6 mL, obtendo-se uma concentração final de 2,5 mg de ITZ/mL. As etapas do teste de degradação forçada encontram-se exemplificadas na **Figura 9**, a seguir. Exceto a degradação forçada correspondente a condição de calor a 60 °C, todos os demais testes foram conduzidos à temperatura ambiente.

**Figura 9:** Etapas do teste de degradação forçada. (A) Etapas da degradação forçada da formulação, placebo ou branco (DMSO). (B) Etapas da degradação forçada do IFA. (C) Etapas da degradação forçada do controle (formulação, placebo e IFA com adição de água ao invés de solução de estresse/neutralizante). \*A etapa de adição de neutralizante ou água só ocorre na degradação ácida e básica, sendo que o agente neutralizante da degradação ácida é uma base e o da degradação básica é um ácido. Nos casos da degradação por peróxido, íons, calor e luz, após a etapa de exposição, prossegue-se diretamente para a etapa de adição de diluente.



Sabendo-se que o ITZ pode ser identificado por CLAE usando um detector de UV, adotou-se, inicialmente, o comprimento de onda de 225 nm (descrito para ITZ cápsulas na USP-NF (2019)). Nas análises de teor e de impurezas, adotou-se as concentrações de 100 µg de ITZ/mL e 2,5 mg de ITZ/mL, respectivamente, como descrito para ITZ cápsulas na USP43-NF38. Inicialmente foi utilizada eluição por gradiente (**Tabela 3**) tendo como diluente metanol/Tetrahidrofurano (50:50). As demais condições cromatográficas encontram-se especificadas na **Tabela 2**.

**Tabela 3:** Eluição por gradiente - fase 1 do desenvolvimento do método analítico para doseamento do itraconazol e quantificação de impurezas na formulação.

Tempo (minutos)	Solução A (%)	Solução B (%)
0	60	40
25	45	55
40	45	55
42	60	40
50	60	40

Em um segundo momento, com o objetivo de otimizar os resultados, foi realizada uma alteração na eluição por gradiente para avaliação das impurezas na formulação **GT64** (**Tabela 4**).

**Tabela 4:** Eluição por gradiente - fase 2 do desenvolvimento do método analítico para doseamento do itraconazol e quantificação de impurezas na formulação.

Tempo (minutos)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)
0	100	0
50	0	100
51	100	0
55	100	0

#### 4.2.5.3.3 Seletividade do método analítico

A seletividade de um método analítico indica a capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, de maneira confiável, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas e componentes da matriz (ANVISA, 2003). A seletividade pode ser determinada por meio da avaliação dos *endpoints* das amostras, que

são as condições de estresse em que a amostra apresenta recuperação superior a 70% (ANVISA, 2015). Busca-se assim a verificação de parâmetros como separação satisfatória dos picos dos produtos de degradação relevantes, impurezas conhecidas e pico principal, entre si e em relação aos componentes da matriz de análise, bem como a pureza do pico correspondente ao IFA. A avaliação da seletividade também permite a obtenção de informações sobre a compatibilidade e o efeito da formulação em relação à estabilidade.

Para avaliação da seletividade, foram analisadas amostras do placebo, padrão primário USP, IFA e formulação; além dos *endpoints* dos testes de degradação da formulação, placebo, IFA e solução branco. Essas amostras foram preparadas conforme especificado no tópico 4.2.5.2 e avaliadas nas concentrações de 2,5 mg de ITZ/mL e 100 µg de ITZ/mL.

#### 4.2.5.3.4 Adequabilidade do sistema

Com o objetivo de avaliar se o equipamento está apto a gerar resultados com exatidão e precisão aceitáveis, a adequabilidade do sistema foi verificada. Para a avaliação de impurezas, a adequabilidade do sistema foi avaliada frente aos parâmetros de desvio padrão relativo (DPR) para ITZ, devendo ser  $\leq 5,0\%$  (ANVISA, 2003); e à recuperação do ITZ dentro da faixa de 95,0-105,0%, sendo importante ressaltar que a resolução nº 899 (guia para validação de metodologia analítica) não estabelece valor referência para esse parâmetro. Assim, definiu-se que o método seria exato se os resultados cumprissem a faixa de aceitação de 95,0-105,0%. As condições cromatográficas foram as especificadas no **Tópico 4.2.5.1**. Após a injeção da **solução padrão 3** (em quintuplicata), os parâmetros de adequabilidade do sistema foram verificados. Posteriormente, preparou-se e injetou-se (em duplicata) uma nova **solução padrão 3** (padrão de confirmação), determinando-se assim a média e o DPR da área do pico do analito. Após obtenção das áreas sob a curva, calculou-se a porcentagem de recuperação utilizando a **Equação 1**:

$$\text{Equação 1} \quad \text{Recuperação (\%)} = \frac{A_{pd1} \times M_{pd2}}{A_{pd2} \times M_{pd1}} \times 100$$

Onde:  $A_{pd1}$ : média das áreas dos picos do analito obtidos nos cromatogramas da primeira preparação da **solução padrão 3**

$A_{pd2}$ : média das áreas dos picos do analito obtidos nos cromatogramas da segunda preparação da **solução padrão 3** (padrão de confirmação)

$M_{pd1}$ : massa pesada do analito para a primeira preparação da **solução padrão 3** (mg)

$M_{pd2}$ : massa pesada do analito para a segunda preparação da **solução padrão 3** (mg) (padrão de confirmação)

Em um segundo momento, injetou-se a **solução amostra 1** (duplicata) e calculou-se a % de impurezas presentes na solução amostra, aplicando-se a **Equação 2**:

$$\text{Equação 2} \quad \text{Impureza (\%)} = \frac{A_{am}}{A_{pd}} \times \frac{C_{pd}}{C_{am}} \times 100$$

Onde:  $A_{am}$ : área sob o pico da impureza obtido no cromatograma da **solução amostra 1**

$A_{pd}$ : área sob o pico do analito obtido no cromatograma da **solução padrão 3**

$C_{am}$ : concentração de trabalho da **solução amostra 1** ( $\mu\text{g/mL}$ )

$C_{pd}$ : concentração do analito na **solução padrão 3** ( $\mu\text{g/mL}$ )

Para a avaliação da adequabilidade do sistema frente à concentração de teor do ITZ (100 de  $\mu\text{g/mL}$ ), os parâmetros utilizados foram os DRP resultantes das análises, respeitando-se o valor especificado de  $\leq 2,0\%$  (ANVISA, 2010). Além da recuperação do ITZ, que deve se encontrar na faixa de 98,0-102,0%, também avaliamos a **solução padrão 2** (quintuplicata) na adequabilidade do sistema. Em seguida, uma nova **solução padrão 2** (padrão de confirmação) foi preparada e injetada em duplicata. Finalizadas as análises, a média e o DPR da área do pico do ITZ foram obtidos e calculou-se a % de recuperação conforme **Equação 3**:

$$\text{Equação 3} \quad \text{Recuperação (\%)} = \frac{A_{pd3} \times M_{pd4}}{A_{pd4} \times M_{pd3}} \times 100$$

Onde:  $A_{pd3}$ : média das áreas dos picos do analito obtidos nos cromatogramas da primeira preparação da **solução padrão 2**

$A_{pd4}$ : média das áreas dos picos do analito obtidos nos cromatogramas da segunda preparação da **solução padrão 2** (padrão de confirmação)

$M_{pd3}$ : massa pesada do analito para a primeira preparação da **solução padrão 2** (mg)

$M_{pd4}$ : massa pesada do analito para a segunda preparação da **solução padrão 2** (mg) (padrão de confirmação)

Em um segundo momento, preparou-se uma **solução amostra 2** (duplicata, padrão de confirmação) e injetou-se, calculando-se o teor de ITZ a partir da aplicação da **Equação 4**:

$$\text{Equação 4} \quad \text{Teor (\%)} = \frac{A_{am}}{A_{pd}} \times \frac{C_{pd}}{C_{am}} \times 100$$

Onde:  $A_{am}$ : área sob o pico do analito obtido no cromatograma da **solução amostra 2**

$A_{pd}$ : área sob o pico do analito obtido no cromatograma da **solução padrão 2**

$C_{am}$ : concentração teórica da **solução amostra 2** ( $\mu\text{g/mL}$ )

$C_{pd}$ : concentração da **solução padrão 2** ( $\mu\text{g/mL}$ )

#### 4.2.5.3.5 Balanço de massas

O cálculo de balanço de massas é utilizado para se quantificar os picos de degradação, obtendo-se principalmente a informação a respeito da quantidade de amostra perdida em relação ao composto original. O balanço de massa ideal é aquele que se aproxima de 100%, contudo, um balanço de massa aceitável encontra-se entre uma faixa de 90 e 110% (LUKULAY; HOKANSON, 2005). Para realização do cálculo em questão foi empregada a **Equação 5**:

$$\text{Equação 5} \quad \text{Balanço de massa} = \bar{x} \text{ da \% de teor} + (\bar{x} \text{ da \% de impurezas na amostra em condição de estresse} - \bar{x} \text{ da \% de impurezas na amostra sem exposição a condições de estresse})$$

#### 4.2.6 Estudo clínico em felinos com esporotricose

O estudo clínico foi conduzido em parceria com a Escola de Veterinária da UFMG, sendo os gatos oriundos de uma ONG de animais localizada na cidade de Belo Horizonte. Na ONG há vários animais que apresentam doenças, como esporotricose, os quais encontram-se alojados em gaiolas para evitar a contaminação dos animais sadios. A amostra do estudo é de conveniência e constituída por gatos de ambos os sexos, com esporotricose confirmada pelo isolamento de *Sporothrix* spp. na data do primeiro atendimento, anterior a inclusão no estudo. Todos os procedimentos do estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA 24/2020) (**ANEXO I**) e acompanhados

pelo responsável da ONG parceira, que manifestou concordância por meio do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**ANEXO II**).

Ao todo, 10 gatos foram submetidos ao tratamento com a formulação **GT64** até o ponto de corte para compilação dos resultados presentes nesta dissertação. O tempo de duração do tratamento variou de 9 dias a aproximadamente 2 meses. Os animais selecionados para o estudo clínico foram submetidos a exame clínico geral e coleta de amostras biológicas para realização de exames laboratoriais (hemograma completo e bioquímica sérica). Também foi realizado o registro fotográfico a cada consulta para o acompanhamento e registro da evolução clínica; bem como contatos telefônicos frequentes com o responsável pela ONG.

O exame físico dos animais incluiu a avaliação do estado geral, observando-se o aspecto clínico e localização das lesões. Para o acompanhamento das características laboratoriais dos animais, foi realizada coleta de sangue sem sedação, após antissepsia do local com álcool 70%. Foram coletados aproximadamente 1,5 mL de sangue total da veia jugular externa ou das patas posteriores, utilizando uma seringa descartável agulhada (0,70x30mm), para a realização de hemograma completo e bioquímica sérica.

A via subcutânea foi selecionada para administração da formulação a fim de prevenir reações inflamatórias no local de injeção. Embora tumores intramusculares se desenvolvam com frequência semelhante à da via subcutânea, são mais difíceis de se detectar precocemente (HARTMANN *et al.*, 2015). Inicialmente foi proposta a administração de 2 mL da formulação desenvolvida por via subcutânea em cada um dos animais inseridos no estudo (o volume de 2 mL de formulação corresponde à administração de aproximadamente 20 mg de ITZ). Porém, para um dos animais, a veterinária dobrou a dose, sendo administrados 2 mL em cada pata traseira, totalizando a administração de 40 mg de ITZ. Importante ressaltar que este aumento respeitou as doses de segurança, tanto do fármaco quanto dos excipientes presentes na formulação em estudo.

O estudo foi iniciado com 4 animais com diferentes manifestações da esporotricose, sendo estabelecido um intervalo de 14 dias entre a primeira e a segunda aplicações. A partir dos resultados obtidos nas duas primeiras aplicações, foi

realizada a diminuição no intervalo entre as administrações para 7-8 dias, em média, e incluídos mais animais, chegando-se a total de 10 animais. Porém, um dos animais foi removido do estudo devido ao agravamento do quadro clínico, sendo realizada a alteração da terapêutica para tratamento dos sinais e sintomas do quadro agravado. Assim, 09 animais foram tratados com a formulação desenvolvida, denominada **GT64**, até o ponto de corte (compilação dos resultados para apresentação na presente dissertação).

Durante a condução do estudo, outros medicamentos também foram utilizados para tratamento de outras condições apresentadas pelos animais, como medicamentos antipulgas, anti-inflamatórios, antibióticos, analgésicos. Também foi utilizado iodeto de potássio e/ou ITZ oral, dependendo da gravidade do quadro. Essas medidas foram adotadas com vistas a sempre oferecer uma melhor condição vida aos animais e evitar que a presença de outras condições pudesse interferir no tratamento da esporotricose com a formulação **GT64**.

#### *4.2.7 Análises estatísticas*

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa GraphPad Prism®, versão 9.0.2 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Os resultados da caracterização das formulações foram avaliados por ANOVA *One-way*, com pós-teste de Tukey, após a verificação da normalidade (Shapiro-Wilk) e homoscedasticidade (Brown-Forsythe) dos resíduos. No caso da comparação entre dois grupos, foi realizado o teste de t, após verificação da normalidade (Shapiro-Wilk) e homoscedasticidade (teste F). Os resultados do estudo clínico foram avaliados por ANOVA *Two-way*, com pós-teste de Tukey, após avaliação da homoscedasticidade (Spearman) e normalidade (Shapiro-Wilk) dos resíduos. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Estudos de pré-formulação

Para a realização dos estudos de pré-formulação, foram avaliadas as funções farmacotécnicas mais comumente desempenhadas pelos possíveis excipientes a serem utilizados no presente estudo, conforme levantamento feito na literatura científica, estando as respectivas funções farmacotécnicas descritas na **Tabela 5**, a seguir:

**Tabela 5:** Codificação e função farmacotécnica dos excipientes utilizados no desenvolvimento da formulação proposta.

<b>Codificação</b>	<b>Função farmacotécnica</b>	<b>Codificação</b>	<b>Função farmacotécnica</b>
X1	Conservante, antimicrobiano, agente solubilizante	X10	Agente solubilizante
X2	Agente solubilizante	X11	Agente solubilizante
X3	Tensoativo	X12	Agente solubilizante
X4	Veículo oleaginoso, solvente	X13	Veículo isotônico
X5	Agente estabilizador	X14	Agente emulsificante, agente solubilizante
X6	Agente de redispersão, inibidor de cristalização, solubilizante	X15	Agente emulsificante
X7	Agente emulsificante, agente solubilizante	X16	Agente solubilizante
X8	Agente emulsificante, agente solubilizante	X17	Veículo
X9	Veículo oleaginoso, agente solubilizante	X18	Corretor de pH

### 5.1.1 Avaliação da solubilidade do itraconazol em diferentes excipientes grau farmacêutico

Após a seleção dos excipientes mais promissores a partir dos resultados da revisão bibliográfica, foi realizada a avaliação da solubilidade do ITZ nos excipientes selecionados. Os resultados obtidos na avaliação da solubilidade do ITZ estão ilustrados na **Tabela 6**, sendo a solubilidade classificada conforme especificado na Farmacopeia Brasileira, 6ª edição (**Tabela 1**). Como pode ser observado, na maioria dos excipientes o ITZ foi considerado praticamente insolúvel ou insolúvel. Somente no X1 o ITZ foi facilmente solúvel; e no X11 o ITZ foi muito pouco solúvel.

**Tabela 6:** Resultados do teste de solubilidade mínima do itraconazol (ITZ) em diferentes excipientes aprovados para administração parenteral na área veterinária.

<b>Excipientes</b>	<b>0,01 mL</b>	<b>0,09 mL</b>	<b>0,2 mL</b>	<b>0,7 mL</b>	<b>9 mL</b>	<b>10 mL</b>	<b>Termo descritivo</b>
X15	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Praticamente insolúvel ou insolúvel
X1	Não	<b>Sim</b>	-	-	-	-	Facilmente solúvel
X2	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Praticamente insolúvel ou insolúvel
X11	Não	Não	Não	Não	Não	<b>Sim</b>	Muito pouco solúvel
X8	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Praticamente insolúvel ou insolúvel
X4	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Praticamente insolúvel ou insolúvel
X3	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Praticamente insolúvel ou insolúvel

**Tabela 6:** Resultados do teste de solubilidade mínima do itraconazol (ITZ) em diferentes excipientes aprovados para administração parenteral na área veterinária (continuação).

<b>Excipientes</b>	<b>0,01 mL</b>	<b>0,09 mL</b>	<b>0,2 mL</b>	<b>0,7 mL</b>	<b>9 mL</b>	<b>10 mL</b>	<b>Termo descritivo</b>
X10	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Praticamente insolúvel ou insolúvel
X12	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Praticamente insolúvel ou insolúvel

A utilização do X1 na solubilização do ITZ visando a obtenção de diferentes formas farmacêuticas já é bem documentada na literatura científica. Em um estudo conduzido por Jagdale e Nawale (2019), a solubilidade do ITZ em 13 solventes puros (água, dimetilsulfóxido, acetonitrila, metanol, 1,4-butanodiol, etanol, álcool isopropílico, n-butanol, octanol, acetato de etila, tolueno, benzeno, 1,4-dioxano) foi estimada por cálculos matemáticos, sendo identificado que a solubilidade do ITZ seria menor em solventes polares e maior em solventes não polares.

O ITZ apresenta solubilidade em água deionizada inferior a 1 ng/L e log P de 5,66. Assim, a permeabilidade através das biomembranas é considerada muito alta, o que é típico de fármacos classe II, de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica. Adicionalmente, uma vez que o ITZ é uma base fraca, uma maior solubilidade é encontrada em soluções ácidas (YIN *et al.*, 2015). Em um estudo conduzido por Alam *et al.*, (2010) e Mohanty *et al.*, (2013), foi avaliada a solubilidade do ITZ em vários excipientes avaliados neste trabalho, assim, os resultados obtidos no presente estudo são compatíveis com os descritos na literatura.

Frente aos resultados obtidos, o X1 foi escolhido com solvente primário para solubilização do ITZ, estando presente em todas as 133 formulações produzidas, onde diferentes excipientes foram associados em diferentes concentrações.

*5.1.2 Desenvolvimento das formulações: definição da forma farmacêutica, via de administração e dose*

Ao se trabalhar com fármacos pouco solúveis em água, como o ITZ, e tendo-se em vista as limitações de excipientes e concentrações aplicáveis a formulações parenterais, a forma farmacêutica suspensão pode ser uma opção interessante, uma vez que não demanda a solubilização total do fármaco e ainda possibilita a liberação controlada do mesmo (BUCHANAN *et al.*, 2007; KALYANI *et al.*, 2013). Assim como na área humana, na medicina veterinária as suspensões injetáveis também são utilizadas no desenvolvimento de medicamentos nos quais uma liberação controlada é desejada. Como exemplos de medicamentos disponíveis comercialmente, tem-se o anti-inflamatório Atriben, indicado para administração intramuscular, subcutânea e intrasinovial em cães, gatos e equinos (HOLLIDAY, 2021) e o antimicrobiano Agemoxi, indicado para aplicação intramuscular ou subcutânea em gatos e em outras espécies de animais (AGENER, 2021).

Em virtude das limitações impostas pela solubilidade do ITZ, a concentração de fármaco escolhida para a produção da formulação de interesse foi 10 mg/mL de formulação. Com relação a via de administração a ser empregada, é importante, inicialmente, decidir qual o volume e a forma farmacêutica da formulação a ser desenvolvida. No caso de suspensões injetáveis, as vias de administração disponíveis são a intramuscular, subcutânea e intralesional (JONES, 1983). Para as vias em questão, em felinos, recomenda-se os seguintes volumes: no máximo 2 mL para a via intramuscular, podendo-se realizar até duas injeções ao mesmo tempo (VERTEBRATE ANIMAL RESEARCH, 2020); até 100 mL para a via subcutânea, com o limite de administração de até 3 locais ao mesmo tempo (VERTEBRATE ANIMAL RESEARCH, 2020); e de até 1 mL para a via intralesional em cada lesão (VIEIRA *et al.*, 1998; GREMIÃO *et al.*, 2009; GREMIÃO *et al.*, 2011). Outros parâmetros que devem ser levados em consideração ao se escolher a via de administração são o tipo de ação desejada (local ou geral), rapidez da ação desejada, além da natureza do medicamento, se são inalatórios, resistentes ou não ao suco gástrico, se são cáusticos e se são solúveis/insolúveis no meio (SILVA, 1998). No caso da formulação proposta, optou-se por trabalhar com a via subcutânea, conforme justificado anteriormente.

### 5.1.3 Desenvolvimento farmacotécnico

Após a seleção dos excipientes, avaliação da solubilidade do ITZ, definição da forma farmacêutica, concentração do ITZ e via de administração, iniciamos o desenvolvimento farmacotécnico das formulações. Inicialmente, foram avaliadas 133 formulações diferentes, sendo a mais promissora a formulação **GT64**. A formulação **GT64** propiciou maior solubilização do ITZ nos excipientes escolhidos e fácil ressuspensão dos cristais de ITZ.

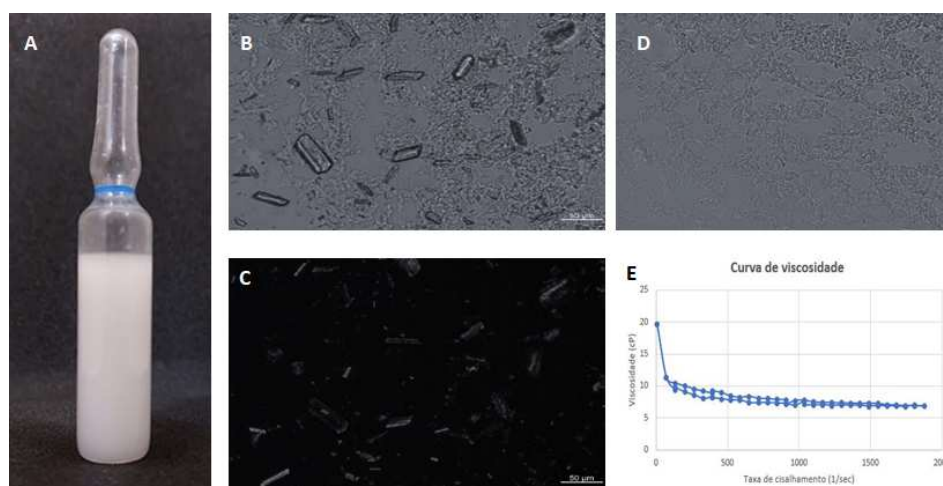
A respeito das funções farmacotécnicas dos excipientes utilizados nas formulações, o excipiente X1 foi utilizado como solubilizante e X8 foi utilizado como tensoativo não-iônico (ROWE *et al.*, 2009). Rhee *et al.* (2007) observaram que a posição mais favorável do ITZ seria na interface das micelas formadas pelo tensoativo, assim, o ITZ tenderia a se alinhar com as moléculas de surfactante que formam a micela, favorecendo a dispersão do ITZ na formulação. A seleção do X11 como excipiente, por sua vez, é justificada pela ação solubilizante e baixa toxicidade (ROWE *et al.*, 2009). O X15 foi adicionado à formulação por favorecer a solubilidade do ITZ, uma vez que a solubilidade do ITZ é favorecida em pH ácido, fazendo com que o X15 seja um excipiente promissor (PRENTICE & GLASMACHER, 2005; YIN *et al.*, 2015). O X18 foi adicionado à formulação como corretor de pH, sendo um excipiente muito utilizado em formulações farmacêuticas devido à biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixo custo (ROWE *et al.*, 2009). Por último, o excipiente X17 foi utilizado como veículo (ROWE *et al.*, 2009). A respeito da toxicidade dos excipientes, é válido ressaltar que todos estes foram utilizados em concentrações inferiores às concentrações consideradas tóxicas (ROWE *et al.*, 2009), contudo, devido ao sigilo das informações do projeto de pesquisa em questão, não serão citadas as concentrações dos excipientes utilizados no desenvolvimento das formulações.

## 5.2 Caracterização da formulação

### 5.2.1 Aspecto visual

A **Figura 10** ilustra o aspecto macroscópico da formulação **GT64**. Como pode ser observado, a formulação apresenta-se como suspensão turva, sem presença de partículas aderidas à parede da ampola, sendo facilmente ressuspendida.

**Figura 10:** Caracterização da formulação **GT64**. (A) Aspecto macroscópico da formulação **GT64**; (B) Imagem de microscopia de luz polarizada da formulação **GT64** em campo claro; (C) e Imagem de microscopia de luz polarizada da formulação **GT64** em campo escuro. Em ambas as imagens (B e C), é possível observar a presença dos cristais de itraconazol em suspensão. Na imagem em campo claro (C) também é possível observar a presença de uma matriz polimérica estabilizando os cristais em suspensão (aumento de 200x); (D) Imagem de microscopia de luz polarizada da formulação placebo da **GT64** em campo claro, onde é possível observar uma matriz polimérica dispersa em suspensão (aumento de 200x); (E) Curva de viscosidade da formulação **GT64**.



### 5.2.2 Microscópica de luz polarizada

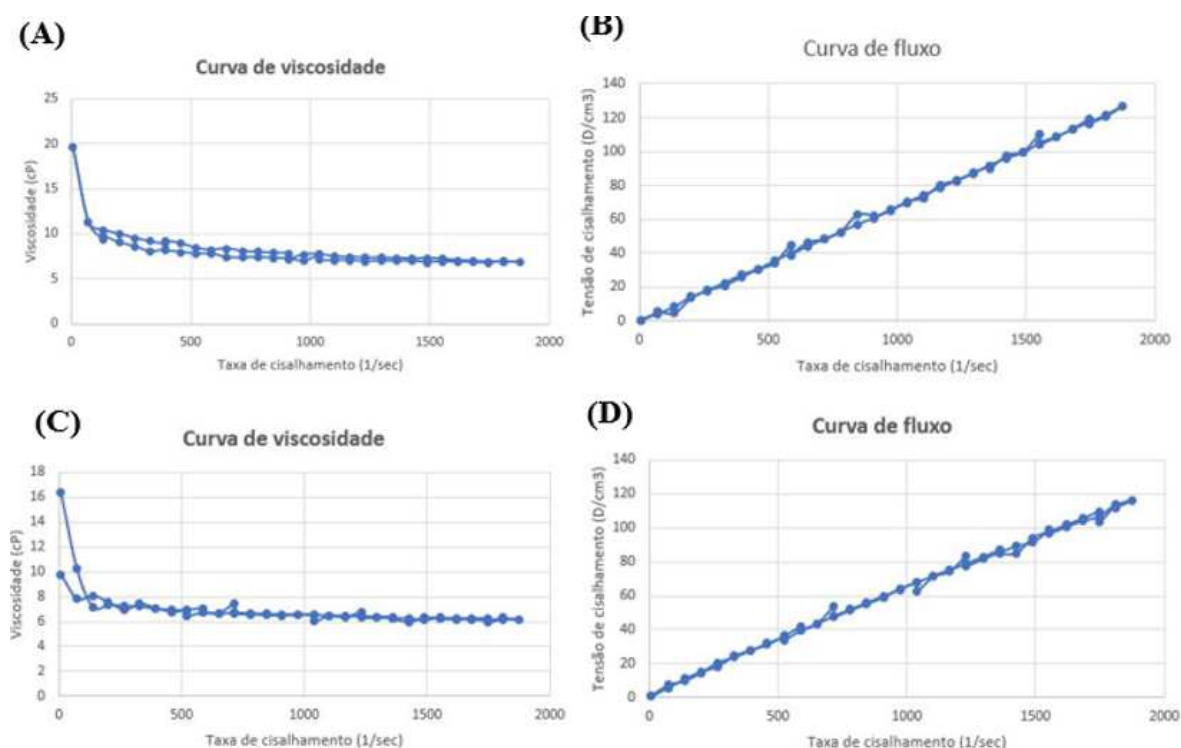
A **Figura 10B-C** ilustra a imagem microscópica da formulação **GT64** utilizando luz polarizada em um fundo claro (**Figura 10B**) e em um fundo escuro (**Figura 10C**), onde é possível observar a presença dos cristais de ITZ em suspensão. Além dos cristais também é possível observar uma “matriz” polimérica estabilizando os cristais, a qual é mais facilmente observada na formulação placebo (**Figura 10D**). Com relação à forma dos cristais de ITZ observados na suspensão, de modo geral, prefere-se a forma esférica para formulações injetáveis, uma vez que as formas de agulha podem causar irritação ou desconforto (MACHKOVECH *et al.*, 2012). No entanto, existem produtos no mercado contendo partículas de insumo farmacêutico ativo em forma de agulha, como visto para Insuman<sup>®</sup> Basal (SANOFI AVENTIS) e Protaphane<sup>®</sup> Penfill (NOVO NORDISK).

### 5.2.3 Avaliação da viscosidade

A **Figura 10E** ilustra o perfil reológico observado para a formulação **GT64**. Como pode ser observado, a formulação apresenta um perfil não-Newtoniano

pseudoplástico, na qual a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento. Assim, na presença de uma pressão, as moléculas se organizam no sentido do escoamento, oferecendo menor resistência (GENNARO, 2000; NETZ, 2002). Esse comportamento é característico de formulações farmacêuticas nas quais há dispersões floculadas (MARTIN *et al.*, 1993; GENNARO, 2000). A formulação placebo também apresentou um perfil reológico semelhante, fornecendo um indício que a adição de ITZ na formulação não alterou o seu perfil reológico (**Figura 11**).

**Figura 11:** Curva de viscosidade e de fluxo da formulação **GT64** e de seu respectivo placebo. (A) viscosidade da formulação **GT64**. (B) Curva de fluxo da formulação **GT64**. (C) Curva de viscosidade do placebo da formulação **GT64**. (D) Curva de fluxo do placebo da formulação **GT64**.



#### 5.2.4 Tamanho de partícula

A avaliação do tamanho das partículas de uma formulação é um aspecto importante, pois o tamanho das partículas pode impactar significativamente na dissolução e absorção do fármaco (GARAD *et al.*, 2010). No caso da formulação **GT64**, cerca de 90% das partículas (Dx 90) apresentou aproximadamente 40  $\mu\text{m}$  de tamanho, enquanto para o placebo (**PGT64**) foi de 1  $\mu\text{m}$  (**Tabela 7**).

**Tabela 7:** Análise do tamanho das partículas presentes nas formulações carregadas com itraconazol (**GT64**) e seu respectivo placebo (**PGT64**).

<b>Formulação/Placebo</b>	<b>Dx (10)</b>	<b>Dx (50)</b>	<b>Dx (90)</b>
<b>GT64</b>	6,85 µm	22,7 µm	39,6 µm
<b>PGT64</b>	0,25 µm	0,422 µm	1,14 µm

A presença de partículas no placebo pode ser decorrente da presença das micelas formadas na formulação (MCCLEMENTS, 2012), que podem estar compondo a matriz observada nas imagens obtidas nas análises por microscopia óptica.

### 5.2.5 Análise do pH

A análise de pH foi realizada em triplicata, por meio da avaliação de 3 lotes diferentes da formulação **GT64**, obtendo-se o valor médio de  $3,04 \pm 0,096$ . A definição do pH de uma formulação deve propiciar a estabilidade do fármaco. No caso do ITZ, a solubilidade é aumentada em pH ácido, uma vez que se trata de uma base fraca, apresentando pKa de 3,7 e log P de 5,66 (BUDAVARI, 1996; PRENTICE & GLASMACHER, 2005; LESTNER & HOPE, 2013). Ao avaliarmos a via de administração, deve-se, entretanto, observar as limitações do local de administração. No medicamento Telazol (uma solução injetável para administração intramuscular em cães e gatos), por exemplo, foi estabelecido uma faixa de pH entre 2 e 3,5 (ZOETIS, 2019). Portanto, o pH da formulação encontra-se dentro da faixa utilizada em formulações comerciais.

### 5.2.6 Osmolaridade

#### 5.2.6.1 Cálculo teórico e avaliação por meio do osmômetro criométrico

Conforme especificado no **Tópico 4.2.2.2**, o equivalente de NaCl (Eq) para cada um dos excipientes foi calculado.

Em seguida, relacionamos o Eq à concentração da substância na formulação e verificamos a quantidade de cloreto de sódio que a substância contribui na formulação. Na sequência, calculamos a osmolaridade esperada para a formulação desenvolvida, que foi 0,766 Osm/Kg.

O cálculo para avaliação da osmolaridade do placebo seguiu o mesmo raciocínio exposto para a avaliação da osmolaridade da formulação teste, contudo, desconta-se o valor que se deve à presença de ITZ no meio. Logo, no caso do placebo da



formulação **GT64**, o valor de osmolaridade obtido por meio de cálculo teórico é de  $\sim 0,750$  Osm/Kg. Já avaliação realizada por meio do osmômetro criométrico resultou em valores de osmolaridade de  $0,795$  Osm/Kg  $\pm 0,005$  e  $0,792$  Osm/Kg  $\pm 0,004$  para a formulação **GT64** e seu placebo, respectivamente. É importante destacar que os valores teóricos e obtidos por meio de avaliação no osmômetro ficaram próximos, tanto para a formulação quanto para o seu respectivo placebo. Destaca-se também que a formulação em questão pode ser considerada hiperosmótica, pois o valor obtido na avaliação da osmolaridade ( $\sim 0,766$  Osm/Kg como valor teórico e  $\sim 0,795$  Osm/Kg como valor obtido por meio de avaliação no osmômetro) é superior à concentração equivalente de NaCl em uma solução isoosmótica, que corresponde a aproximadamente  $0,308$  Osm/Kg. De modo geral, visando-se prevenir principalmente a ocorrência de dor e irritação local, recomenda-se que o limite superior de osmolaridade seja  $0,600$  Osm/kg para medicamentos administrados pela via intramuscular ou subcutânea (KIM *et al.*, 1990; DEL BIANCO *et al.*, 1996; LEI & YOU, 2012). No entanto, valores mais elevados de osmolaridade também são observados em diferentes formulações parenterais, a exemplo de formulações de etomidato contendo propilenoglicol, na qual a osmolaridade é de aproximadamente  $4,900$  Osm/Kg (NIEDERMIRTL *et al.*, 2018).

### **5.3 Determinação de sensibilidade dos isolados de *Sporothrix brasiliensis* pelo método de concentração inibitória mínima**

Complementarmente aos estudos de pré-formulação, realizamos estudos *in vitro* para avaliação da sensibilidade de isolados de *S. brasiliensis* ao IFA e ao X1, excipiente selecionado como principal solvente do IFA.

#### **5.3.1 Avaliação da concentração inibitória mínima do IFA e do X1 em isolados de *S. brasiliensis***

Nas duas placas nas quais foi aplicado o ITZ, não foi observado crescimento da cultura fúngica em nenhuma das concentrações do fármaco. Segundo Espinel-Ingroff e colaboradores (2017), que propuseram um valor de corte epidemiológico, isolados que apresentarem  $CIM \leq 2$   $\mu\text{g/mL}$  podem ser considerados sensíveis ao ITZ e  $CIM > 2$   $\mu\text{g/mL}$  podem ser considerados como isolados resistentes ao ITZ. No presente estudo, todos os isolados de *S. brasiliensis* apresentaram  $CIM < 0,125$

$\mu\text{g/mL}$ , sugerindo que as cepas avaliadas (S3, S7 e S10) são sensíveis e não-resistentes ao ITZ.

O ITZ exerce atividade antifúngica ao impedir a síntese do ergosterol, um tipo de esterol necessário à formação da membrana celular dos fungos. Essa atividade ocorre a partir do bloqueio da enzima CYP51A, impedindo a conversão do precursor lanosterol em ergosterol (PRASAD *et al.*, 2016). O déficit de ergosterol leva à desorganização da membrana celular e acúmulo de esteróis metilados na membrana, prejudicando o crescimento e a proliferação (SHAPIRO *et al.*, 2011; PEYTON *et al.*, 2015).

Nas duas placas onde foram aplicados o X1, foi observado um leve crescimento do fungo para as cepas S3 e S7, indicando que esses isolados de *S. brasiliensis* apresentaram CIM  $> 8 \mu\text{g/mL}$ . Para a cepa S10, não foi observado crescimento, permitindo levantar a hipótese de que essa cepa seja mais sensível ao X1. Os resultados preliminares aqui apresentados sugerem que algumas cepas de *S. brasiliensis* podem apresentar sensibilidade ao X1, fornecendo indícios de que sua associação ao ITZ no desenvolvimento de formulações para tratamento de infecções fúngicas pode ser benéfica.

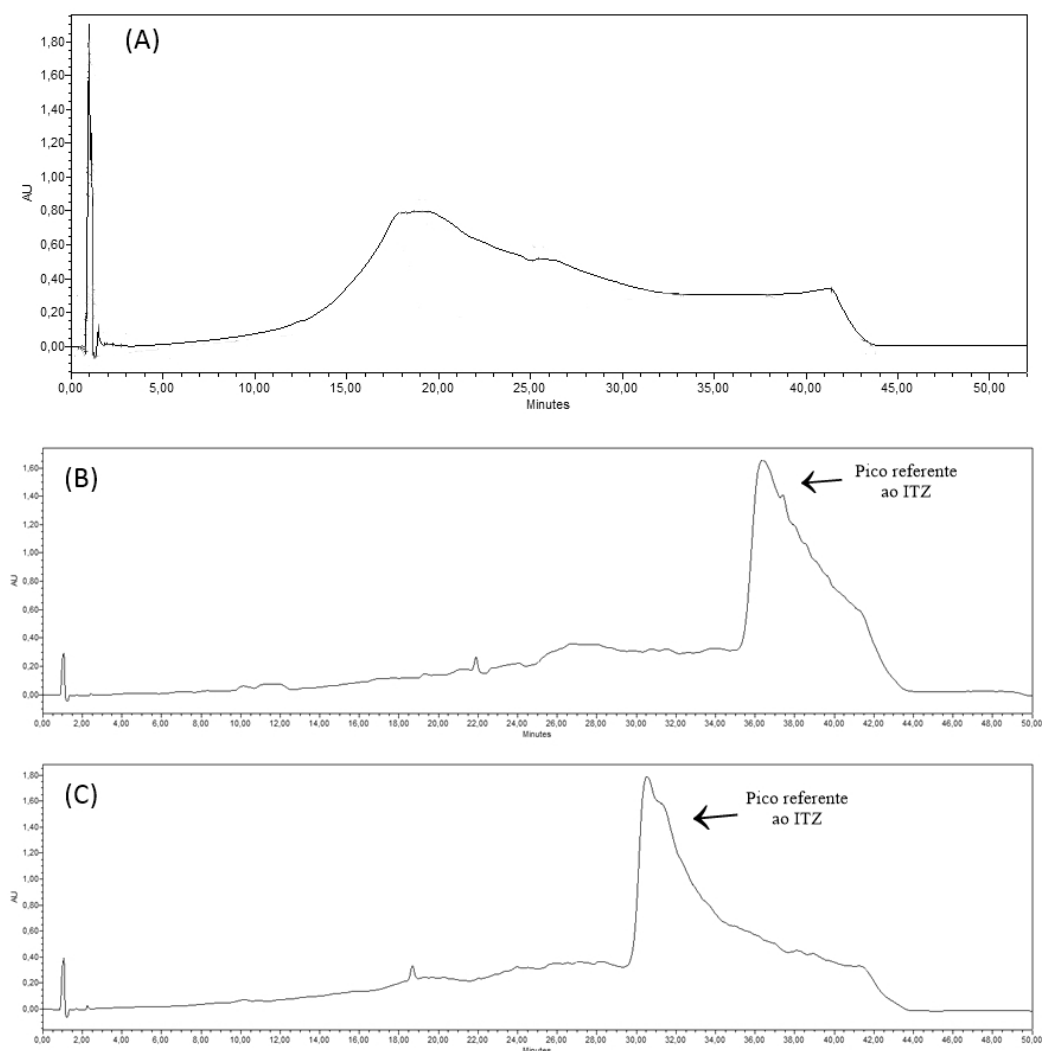
#### **5.4 Desenvolvimento do método analítico para determinação de impurezas e teor do ITZ por CLAE**

##### *5.4.1 Degradação forçada*

A **Figura 12** ilustra os cromatogramas obtidos para a solução diluente (**Figura 12A**) e solução IFA (100  $\mu\text{g}$  de ITZ/mL) (**Figura 12B**) e solução formulação **GT64** (100  $\mu\text{g}$  de ITZ/mL) (**Figura 12C**). Essas soluções foram inicialmente avaliadas para conhecermos o perfil cromatográfico e para avaliarmos se o método analítico estava adequado. Como podemos observar, no cromatograma do IFA (**Figura 12B**) e no cromatograma da formulação **GT64** (**Figura 12C**) há apenas o pico referente ao ITZ entre 30 e 44 minutos. Contudo, os picos apresentam uma cauda longa, apontando para a necessidade de adaptações nas condições cromatográficas. Assim, antes de se avaliarmos as amostras submetidas às diferentes condições de estresse, propomos a alteração da composição da fase móvel, tempo de corrida, temperatura da coluna, concentração de sal e pH da fase móvel visando a

otimização do método. Tendo-se como base a especificação do ITZ cápsulas da USP43-NF38 (**Tabela 4**), alteramos o comprimento de onda de 225 para 259 nm, uma vez que o ITZ apresentou absorção máxima neste último comprimento de onda. Também aumentamos o tempo de corrida, de 50 para 55 minutos; diminuimos a temperatura da coluna de 30 para 20 °C e alteramos a fase móvel, conforme especificado na **Tabela 5**. Essas mudanças propiciaram uma melhor separação entre os picos.

**Figura 12:** Cromatogramas obtidos durante o desenvolvimento do método analítico. (A) Solução diluente. (B) Solução IFA na concentração de 100 µg de ITZ/mL. (C) Solução formulação **GT64** na concentração de 100 µg de ITZ/mL. Leitura realizada no comprimento de onda de 225 nm.



Após otimização do método, foram conduzidos os ensaios de degradação forçada. Os resultados de recuperação de ITZ nas amostras da formulação **GT64** (n= 2) submetidas às condições de estresse estão apresentados na **Tabela 8**. A partir dos

resultados obtidos, foram escolhidos os *endpoints*, que devem corresponder às condições de estresse cuja recuperação do fármaco é superior a 70%. Considerando-se as médias dos resultados obtidos para as amostras **GT64.1** e **GT64.2**, todas as condições de estresse atenderam à especificação, fornecendo indícios da adequada estabilização do ITZ. Logo, optamos por escolher como *endpoints* as condições de estresse mais críticas: HCl 1M (168 h), NaOH 1M (168 h), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% (168 h), FeCl<sub>3</sub> 5 mM (24 h), calor 60 °C (168 h) e luz UV (168 h).

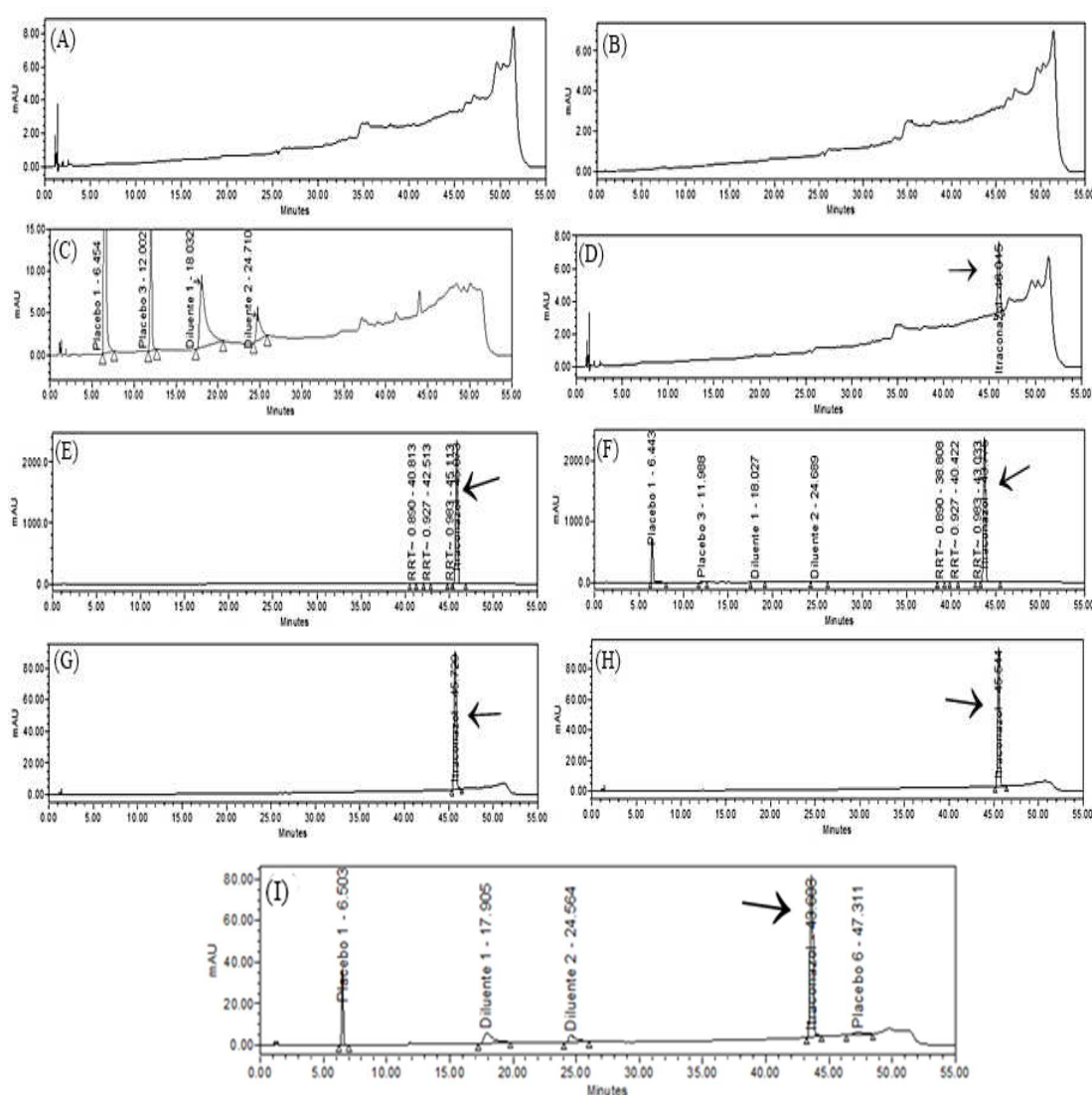
**Tabela 8:** Recuperação do ITZ nas amostras da formulação **GT64** submetidas às diferentes condições de estresse.

Condição de estresse	Amostras	% Recuperação da amostra	Tempo de estresse
HCl 1 M	<b>GT64.1</b>	91,31	168 h
	<b>GT64.2</b>	90,17	
HCl 0,1 M	<b>GT64.1</b>	96,06	168 h
	<b>GT64.2</b>	95,17	
NaOH 1 M	<b>GT64.1</b>	96,50	168 h
	<b>GT64.2</b>	92,35	
NaOH 0,1 M	<b>GT64.1</b>	85,25	168 h
	<b>GT64.2</b>	98,96	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3%	<b>GT64.1</b>	93,10	168 h
	<b>GT64.2</b>	92,60	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,3%	<b>GT64.1</b>	98,70	168 h
	<b>GT64.2</b>	96,01	
FeCl <sub>3</sub> 5 mM	<b>GT64.1</b>	101,02	24 h
	<b>GT64.2</b>	93,78	
Calor 60 °C	<b>GT64.1</b>	93,48	168 h
	<b>GT64.2</b>	94,11	
Luz UV	<b>GT64.1</b>	93,45	168 h
	<b>GT64.2</b>	94,13	

#### 5.4.2 Seletividade do método analítico

Após a obtenção dos *endpoints* das condições de estresse, prosseguimos com a realização do estudo de seletividade (**Figura 13**).

**Figura 13:** Cromatogramas obtidos na etapa de avaliação da seletividade do método analítico. (A) Cromatograma do diluente (Metanol: Tetrahydrofurano 50:50). (B) Cromatograma da fase móvel. (C) Cromatograma do placebo da formulação **GT64**. (D) Cromatograma da solução de padrão primário no método de impurezas (2,5 mg de ITZ/mL). (E) Cromatograma do IFA no método de impurezas (2,5 mg de ITZ/mL). (F) Cromatograma da formulação **GT64** no método de impurezas (2,5 mg de ITZ/mL). (G) Cromatograma da solução de padrão primário do método de teor (100 µg de ITZ/mL). (H) Cromatograma da solução do IFA do método de teor (100 µg de ITZ/mL). (I) Cromatograma da formulação **GT64** do método de teor (100 µg de ITZ/mL). Setas indicam os picos referentes ao ITZ. Picos denominados "Diluyente" indicam os picos provenientes do diluente utilizado. Picos denominados "Placebo" indicam os picos provenientes da matriz da formulação. Picos denominados "RRT" indicam as impurezas encontradas.



As leituras foram conduzidas no comprimento de onda de 259 nm, tempo de corrida de 55 minutos, 20 °C de temperatura da coluna cromatográfica e a fase móvel descrita na **Tabela 5**. Nesta etapa do trabalho, foram avaliadas a formulação nas concentrações de 2,5 mg de ITZ/mL (duplicatas: **GT64.1** e **GT64.2**) e 100 µg de

ITZ/mL (duplicatas: **GT64.1** e **GT64.2**); diluente, placebo (preparado na diluição correspondente à formulação na concentração de 2,5 mg de ITZ/mL, em unicata), padrão primário (concentrações de 2,5 mg de ITZ/mL e 100 µg de ITZ/mL, em unicata para ambas as concentrações), IFA (concentrações de 2,5 mg de ITZ/mL e 100 µg de ITZ/mL, em unicata para ambas as concentrações), além dos *endpoints* das condições de degradação para a formulação, placebos, branco, controle e IFA.

Como pode ser observado, em todos os cromatogramas onde o ITZ estava presente, o tempo de retenção foi de aproximadamente 45 minutos (setas, **Figura 12**). Também é possível observar ausência de interferência do diluente (**Figura 12A**), da fase móvel (**Figura 12B**) e do placebo (**Figura 12C**) no tempo de retenção do analito, bem como das suas impurezas conhecidas (**Figuras 12D - E**). A reprodutibilidade observada para a linha de base fornece um indício que o método está adequado para controle e avaliação dos resultados. Outro ponto a ser destacado é que a solução padrão e a solução de adequabilidade atenderam aos parâmetros de adequabilidade do sistema (**Tabela 9**).

**Tabela 9:** Adequabilidade do sistema do método de impurezas (2,5 mg de ITZ/mL).

Parâmetro	Especificação (método de impurezas)	Resultados (método de impurezas)	Especificação (método de teor)	Resultados (método de teor)
DPR para Itraconazol	≤ 5,0%	0,95%	≤ 2,0%	1,03%
Recuperação para Itraconazol	95,0-105,0%	101,62%	98,0-102,0%	101,59%

Na avaliação da seletividade, foram injetadas as soluções da formulação em todos os *endpoints* das condições de estresse (n= 2; 2,5 mg de ITZ/mL), da solução amostra 1 (formulação na concentração de 2,5 mg de ITZ/mL não exposta às condições de estresse, n= 2), além da reinjeção dos *endpoints* da formulação na concentração de 100 µg de ITZ/mL (n= 2) submetida às condições de estresse; e a solução amostra 2 (formulação na concentração de 100 µg de ITZ /mL não exposta a condições de estresse, n= 2). Os cromatogramas e a relação de impurezas oriundos dessas análises encontram-se ilustrados nos **ANEXOS III a IX**.

Como podemos observar no **ANEXO III**, a solução amostra 1 da formulação não apresentou impurezas em concentração superior ao limite (≤ 0,2%), tanto para

impurezas conhecidas quanto para desconhecidas. Este resultado é muito positivo, pois o não cumprimento deste parâmetro leva à reprovação da formulação, demandando alterações farmacotécnicas, qualificação de impurezas, entre outras intervenções.

A análise de pureza cromatográfica realizada no padrão primário, realizada por meio da comparação entre *Purity angle* e *Purity threshold*, revelou que os picos do analito e das impurezas conhecidas são espectralmente puros e não são atribuídos a mais de um componente, uma vez que o valor encontrado de *Purity angle* foi menor que o de *Purity threshold*, conforme especificação do software Empower® (WATERS, 1996), com valores de 0,079 e 0,287, respectivamente. Com relação à pureza cromatográfica do pico do ITZ nas soluções do IFA, formulação submetida às condições de estresse, e solução amostra 1 (sem exposição a condições de estresse) (**Tabela 10**), os resultados indicaram que o pico do analito é espectralmente puro e não é atribuído a mais de um componente, uma vez que o valor encontrado de *Purity Angle* foi menor que o de *Purity Threshold*, conforme especificação do software Empower® (WATERS, 1996).

**Tabela 10:** Análise da pureza cromatográfica do itraconazol.

Condição	Matéria-prima		Produto acabado GT64	
	<i>Purity angle</i>	<i>Purity threshold</i>	<i>Purity angle</i>	<i>Purity threshold</i>
Controle	0,099	0,307	0,075	0,277
Hidrólise ácida	0,056	0,245	0,096	0,304
Hidrólise básica	0,063	0,251	0,075	0,282
Oxidação	0,066	0,256	0,092	0,321
Íons metálicos	0,105	0,307	0,075	0,277
Calor seco	0,061	0,245	0,096	0,304
Autoclavação	0,070	0,251	0,075	0,282
Fotólise	0,070	0,256	0,092	0,321

A **Tabela 11** ilustra o decaimento no teor de ITZ nas amostras da formulação submetidas às condições de estresse durante a avaliação da seletividade. O processo de degradação é considerado relevante se >10% (ANVISA, 2015). Neste

estudo somente na condição de calor seco (60° C, 168 h) foi observada uma degradação relevante do ITZ (**Tabela 11**).

**Tabela 11:** Decaimento no teor de itraconazol nas amostras da formulação **GT64** submetidas a diferentes condições de estresse.

Condição de estresse	Amostra	Teor (%)	Decaimento (%)
Ácido clorídrico 1 M – 168 h	<b>GT64.1</b>	92,80	7,29
	<b>GT64.2</b>	92,63	
Hidróxido de sódio 1 M – 168 h	<b>GT64.1</b>	102,27	-0,77
	<b>GT64.2</b>	99,26	
Peróxido de hidrogênio 3% - 168 h	<b>GT64.1</b>	93,24	6,67
	<b>GT64.2</b>	93,42	
Cloreto de ferro 5 mM – 24 h	<b>GT64.1</b>	92,91	7,08
	<b>GT64.2</b>	92,93	
Calor seco (60 °C) – 168 h	<b>GT64.1</b>	89,20	10,41
	<b>GT64.2</b>	89,98	
Luz UV – 168 h	<b>GT64.1</b>	91,53	8,46
	<b>GT64.2</b>	91,56	

A **Tabela 12** apresenta uma comparação dos resultados encontrados no presente estudo e resultados descritos na literatura para outras formulações carregadas com ITZ. Como pode ser observado, Parikh *et al.* (2011) observaram uma degradação superior a 10% na condição de estresse ácido para o IFA (HCl 1N, 75 °C, 2 horas). Já Roy *et al.* (2012) encontram um percentual de degradação de 6,30% para o ITZ cápsulas (HCl 1N, 70°C, 30 minutos), percentual semelhante ao encontrado no presente trabalho (7,79%, HCl 1M, temperatura ambiente, 168 horas). Em ambos os casos os percentuais de degradação não são considerados relevantes. Em relação ao estresse oxidativo, Parikh *et al.* (2011) observaram uma degradação de 35,40% para o IFA (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, temperatura ambiente, 2 horas), enquanto Roy *et al.* (2012) encontraram 14,90% para o ITZ cápsulas (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, 70°C, 1 hora). No nosso estudo, as amostras da formulação **GT64** submetidas à oxidação (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, 168 horas) o percentual de degradação foi de apenas 6,67%, sendo importante destacar que, Parikh *et al.* (2011) e Roy *et al.* (2012) avaliaram as condições de estresse no IFA e no ITZ cápsulas, respectivamente. Importante ressaltar que



formulações diferentes, bem como condições de análise diferentes, podem resultar em perfil de degradação forçada diferente, dependendo dos excipientes presentes.

Assim como observado por Parikh *et al.* (2011) e Roy *et al.* (2012), também não observamos produtos de degradação em concentrações relevantes na condição de estresse básico, sendo as condições avaliadas: NaOH 1N, 75 °C, 2 horas; NaOH 5N, 70 °C, 1 hora; e NaOH 1M, temperatura ambiente, 168 horas, respectivamente. Na condição de estresse correspondente à exposição a luz, Parikh *et al.* (2011) encontraram percentual de degradação negligenciável após exposição a luz do sol por 3 dias e luz UV por 40 horas; enquanto Roy *et al.* (2012) encontraram 7,40% (tempo não especificado); estando próximo ao observado para a formulação **GT64** (8,46%, luz UV, 168 horas). Porém, em ambos os casos, os percentuais de degradação encontrados não são considerados relevantes (<10%). Os resultados encontram-se compilados na **Tabela 12**.

**Tabela 12:** Percentuais de degradação do itraconazol sob diferentes condições de estresse observadas no presente estudo e em trabalhos descritos na literatura.

Condição de estresse	% de degradação do itraconazol (ITZ)		
	IFA (Parikh <i>et al.</i> , 2011)	ITZ cápsulas (Roy <i>et al.</i> , 2012)	Suspensão de ITZ (Formulação GT64)
Ácido	10,20% (HCl 1N, 75 °C, 2 horas)	6,30% (HCl 1N, 70°C, 30 minutos)	7,79% (HCl 1M, temperatura ambiente, 168 horas)
Básico	“% de degradação negligenciável” (NaOH 1N, 75 °C, 2 horas)	Sem observação de degradação significativa (NaOH 5N, 70 °C, 1 hora)	Não foi observada degradação. (NaOH 1M, temperatura ambiente, 168 horas)
Oxidativo	35,40% (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3%, temperatura ambiente, 2 horas)	14,90% (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%, 70°C, 1 hora)	6,67% (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3%, temperatura ambiente, 168 horas)
Luz	% de degradação negligenciável (Luz do sol: 3 dias Luz UV: 40 horas)	7,40% (Tempo não especificado)	8,46% (168 horas)
Calor	% de degradação negligenciável (80 °C, 72 horas)	Não foi observada degradação (105°C, 6 horas)	10,41% (60 °C, 168 horas)

Como mencionado anteriormente, de todos os resultados de recuperação obtidos para a formulação **GT64**, foi observada degradação relevante (>10%) apenas na condição de calor 60 °C por 168h, o que demandou uma avaliação mais aprofundada das impurezas encontradas. Com o objetivo de avaliar se as impurezas presentes na formulação eram formadas durante o processo de estresse ou eram provenientes do processo de síntese do IFA, comparamos as impurezas identificadas na solução do IFA e com as identificadas nas amostras da formulação **GT64**, na presença e ausência de estresse (**Tabela 13**).

Como podemos observar na **Tabela 13**, as impurezas **B**, **C** e **D** provavelmente são impurezas decorrentes da síntese do IFA. Na solução do IFA submetido ao estresse térmico essas impurezas se mantiveram praticamente constante, fornecendo um indício de estabilidade térmica do ITZ. Na formulação **GT64** sem estresse, as impurezas destacadas são encontradas na mesma quantidade do IFA sem estresse, fornecendo um indício de estabilidade do ITZ na formulação sem condição de estresse. Contudo, na formulação submetida ao estresse térmico, foi observado um aumento da impureza **C**, as impurezas **B** e **D** foram reduzidas, e outras impurezas foram observadas (**A** e **E**), sendo estas últimas impurezas possivelmente decorrentes do processo de degradação das impurezas **B** e **D**). Importante observar que a impureza **E** (1,54%) superou o limite de 10% dos 10,41% das impurezas totais, indicando ser uma impureza crítica na condição de estresse térmico 60 °C por 168h. Importante destacar também que, diferentemente do observado por Parikh *et al.* (2011) e Roy *et al.* (2012) (**Tabela 13**), o percentual de degradação do ITZ na formulação **GT64** na condição de calor foi superior a 10%. Embora em nosso estudo a formulação tenha sido exposta a uma temperatura 25 a 43% menor que a utilizada nesses estudos, o tempo de exposição muito superior (233 a 2.800 vezes maior), o que dificulta a comparação.

**Tabela 13:** Impurezas presentes na solução do insumo farmacêutico ativo e na formulação **GT64**, com e sem condição de estresse.

Impureza	IFA (sem estresse)	GT64 (sem estresse)	IFA (calor 60 °C – 168h)	GT64 (calor 60 °C – 168h)
(A) RRT~ 0.187	-	-	-	0.12

**Tabela 13:** Impurezas presentes na solução do insumo farmacêutico ativo e na formulação **GT64**, com e sem condição de estresse (continuação).

(B) RRT~ 0.890	0.10	0.11	0.13	0.05
(C) RRT~ 0.927	0.05	0.06	0.06	0.26
(D) RRT~ 0.983	0.09	0.08	0.10	0.04
(E) RRT~ 1.067	-	-	-	1.54

#### 5.4.3 Balanço de massas

Após a avaliação das amostras da formulação **GT64** sem condição de estresse (soluções amostra 1 e 2) e dos respectivos *endpoints* (2,5 e 100 µg de ITZ/mL, sendo as amostras da formulação denominadas **GT64.1** e **GT64.2** para ambas as concentrações) nas diferentes condições de estresse (ácido, básico, íons, oxidação, luz e calor), calculou-se o balanço de massa. O cálculo do balanço de massa foi realizado conforme descrito no tópico **4.2.5.3.5**, tendo-se como base o percentual de impurezas de 0,25 para a condição controle (solução amostra 1 - 2,5 mg de ITZ/mL, sem estresse). Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 14**. Tendo-se como referencial a faixa de concentração aceitável para avaliação do balanço de massa, que deve estar entre 90 e 110% (LUKULAY; HOKANSON, 2005), e com base nos demais resultados obtidos, verificamos que o método apresenta balanço de massas satisfatório (91,16 – 101,47%) e não apresenta coeluição de impurezas relevantes.

**Tabela 14:** Balanço de massa das amostras **GT64.1** e **GT64.2**.

Condição de estresse	Amostra	Teor (%)	Decaimento (%)	Impurezas (%)	PD* (%)	Balanço de massa (%)
Ácido clorídrico 1 M - 168 h	<b>GT64.1</b>	92.80	7.29	0.73	0.45	93.17
	<b>GT64.2</b>	92.63		0.67		
Hidróxido de sódio 1 M - 168 h	<b>GT64.1</b>	102.27	-0.77	0.12	0.71	101.47
	<b>GT64.2</b>	99.26		1.79		
Peróxido de hidrogênio 3% - 168 h	<b>GT64.1</b>	93.24	6.67	2.88	2.63	95.96
	<b>GT64.2</b>	93.42		2.88		

**Tabela 14:** Balanço de massa das amostras **GT64.1** e **GT64.2** (continuação).

Condição de estresse	Amostra	Teor (%)	Decaimento (%)	Impurezas (%)	PD* (%)	Balanço de massa (%)
Cloreto de ferro 5 mM - 24 h	<b>GT64.1</b>	92.91	7.08	2.88	2.63	95.55
	<b>GT64.2</b>	92.93		2.88		
Calor seco (60 °C) - 168 h	<b>GT64.1</b>	89.20	10.41	2.00	1.57	91.16
	<b>GT64.2</b>	89.98		1.63		
Luz - 168 h	<b>GT64.1</b>	91.53	8.46	0.99	0.62	92.16
	<b>GT64.2</b>	91.56		0.74		

\*PD: Produtos de degradação (% impurezas na formulação em condições de estresse - % impurezas na formulação sem exposição a condições de estresse).

### 5.5 Esterilização terminal da formulação **GT64** por calor úmido

Em um primeiro momento, para esterilizar a formulação **GT64**, optamos por utilizar o método de calor úmido, que é o mais recomendando, devido à alta eficiência e segurança (MASTROENI, 2004; PELCZAR *et al.*,1996). Contudo, quando a formulação **GT64** foi autoclavada em uma temperatura de 100 °C, durante 20 minutos, observamos um aumento expressivo da viscosidade da formulação, que adquiriu um aspecto gelificado (**Figura 14**). Com o objetivo de resolver este problema, avaliamos outras condições de (120 °C durante 15 minutos e 127 °C durante 5 minutos). No entanto, o comportamento de gelificação continuou a ocorrer, mesmo quando foram avaliadas outras formulações com composição idêntica à da **GT64**, exceto pela menor concentração de X15, quando este foi substituído pela água acidificada.

**Figura 14:** Formulação **GT64** gelificada após autoclavagem.

Visto que a esterilidade é um atributo crítico de qualidade para formulações parenterais e a esterilização terminal é recomendada preferencialmente em relação

à produção asséptica, adotamos duas medidas para resolver o problema de gelificação da formulação:

1. reformulação da formulação **GT64**, visando a esterilização terminal por calor úmido;
2. avaliação da esterilização terminal do produto por radiação.

Essas duas estratégias estão descritas a seguir.

### **5.6 Reformulação da formulação GT64**

As alterações inicialmente propostas foram: retirada no X15 da formulação; adição de excipientes como X4, X2, X10 e X6 em concentrações variadas; além da tentativa de veiculação de maior quantidade de fármaco. Das formulações propostas, a formulação denominada **GT109** (ITZ a 1%) foi a que mostrou melhores resultados, uma vez que apresentou menor quantidade de partículas visíveis e de menor tamanho, além da facilidade de ressuspensão. É importante destacar que a veiculação de concentrações superiores a 1% de ITZ levou a obtenção de formulações mais viscosas, de difícil ressuspensão e com maior osmolaridade. Assim, optamos por trabalhar com a concentração de fármaco inicialmente proposta (10 mg de ITZ/g de formulação), sendo a formulação **GT109** selecionada para seguir com os estudos de caracterização.

### **5.7 Caracterização e demais informações a respeito da formulação GT109**

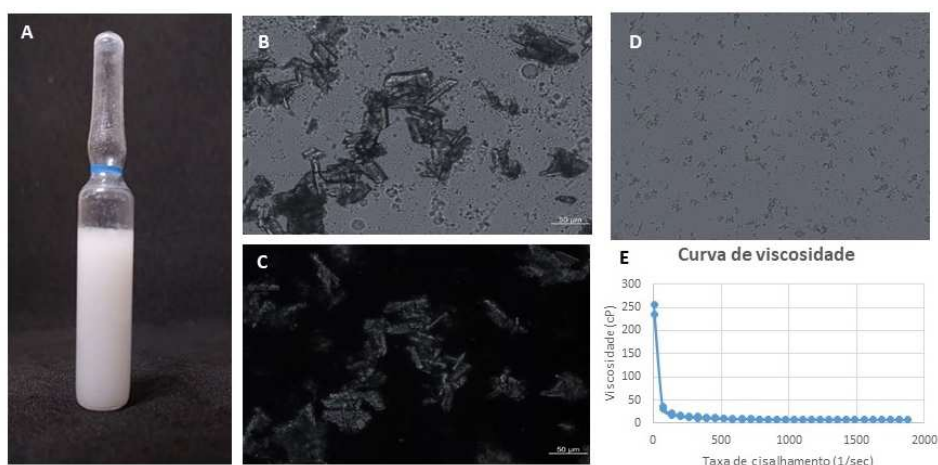
A **Figura 14** ilustra o aspecto visual da formulação **GT109**. Como é possível observar, a formulação apresenta-se como uma solução turva, sendo possível observar a presença de mais particulados aderidos à parede da ampola quando comparada à formulação **GT64**. No entanto, a formulação apresenta facilidade de ressuspensão.

Quando avaliamos a formulação **GT109** no microscópio de luz polarizada, tanto em campo claro (**Figura 15A**) como em campo escuro (**Figura 15B**), é possível se observar a presença de cristais de ITZ formando aglomerados. Diferentemente do observado para a formulação **GT64** (**Figuras 10B-D**), observamos somente a presença de micelas (**Figuras 15A-C**) e não há formação de uma “matriz”

polimérica estabilizando os cristais (**Figura 10D**), o que pode justificar a agregação de cristais facilmente visualizada na formulação **GT109**.

O perfil reológico da formulação **GT109** está ilustrado na **Figura 15E**, o qual é semelhante ao observado para a formulação **GT64** (**Figura 10E**). Assim, as formulações apresentaram um perfil não-Newtoniano pseudoplástico, onde a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento, sendo este comportamento característico de formulações farmacêuticas onde há dispersões floculadas (MARTIN *et al.*, 1993; GENNARO, 2000).

**Figura 15:** Caracterização da formulação **GT109**. (A) Aspecto macroscópico da formulação **GT109**; (B) Imagem de microscopia de luz polarizada da formulação **GT109** em campo claro; (C) e Imagem de microscopia de luz polarizada da formulação **GT109** em campo escuro (presença dos cristais de itraconazol em suspensão). (D) Imagem de microscopia de luz polarizada da formulação placebo da **GT109** em campo claro, onde é possível observar a presença de bolhas (aumento de 200x); (E) Curva de viscosidade da formulação **GT109**.



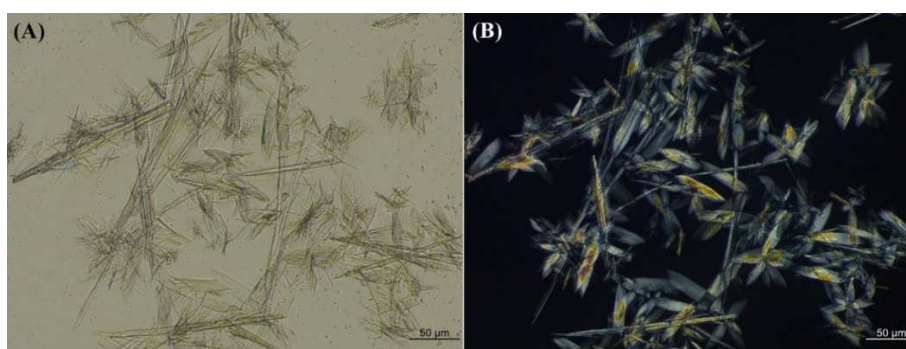
A respeito do pH observado para a formulação **GT109**, o mesmo foi de  $2,99 \pm 0,03$ , sendo semelhante ao observado para a formulação **GT64** ( $3,04 \pm 0,10$ ). Com relação à osmolaridade, os cálculos para a formulação **GT109** foram realizados conforme especificado no **Tópico 4.2.2.2**, resultando em um valor de osmolaridade de  $\sim 960$  mOsm ou  $\sim 0,960$  Osm/Kg. Já o cálculo de osmolaridade para o placebo da formulação **GT109** segue o mesmo raciocínio exposto para o cálculo da osmolaridade da formulação **GT109**, desconsiderando-se apenas a contribuição do fármaco na osmolaridade, que é igual a  $0,0005$  g/mL. Logo, para o placebo da formulação em questão, o valor de osmolaridade calculado foi de  $\sim 0,960$  Osm/Kg.

No entanto, os resultados obtidos na avaliação da osmolaridade das formulações em um osmômetro criométrico foram  $1,396 \text{ Osm/Kg} \pm 0,009$  e  $1,315 \text{ Osm/Kg} \pm 0,000$  para a formulação **GT109** e seu placebo, respectivamente, estando consideravelmente mais elevado do que o valor calculado. A diferença observada entre o valor calculado e o obtido no equipamento pode ser decorrente da presença de excipientes formulação **GT109** que sofrem alterações devido à uma maior hidratação, como o X10 (SANDELL & GORING, 1971; ELWORTHY & FLORENÇA, 1996; SILVA *et al.*, 2022).

Assim como a **GT64**, a formulação **GT109** pode ser considerada hiperosmótica, sendo a osmolaridade obtida superior à osmolaridade da formulação **GT64**. O aumento na osmolaridade aconteceu porque, com a remoção do X15, foi necessário adicionar outros excipientes para estabilizar o ITZ na formulação. As formulações onde a osmolaridade estava menor não permaneceram estáveis. No entanto, como discutido anteriormente, a osmolaridade encontrada ainda está dentro de um valor aceitável.

Quando a formulação **GT109** foi esterilizada por calor úmido, diferentemente da formulação **GT64**, não observamos diferença no aspecto macroscópico. No entanto, quando avaliamos a formulação no microscópio foi possível observar diferenças. A **Figura 16** ilustra o aspecto dos cristais de ITZ na formulação após a autoclavação. Como é possível observar, o tamanho e a morfologia dos cristais de ITZ foram alterados em relação à formulação pré-autoclavação (**Figuras 15B e C**). Após a autoclavação, os cristais apresentam-se mais agregados, na forma de agulhas, formando rosetas.

**Figura 16:** Microscopia de luz polarizada da formulação **GT109** após autoclavação a  $127 \text{ }^\circ\text{C}$ , 5 min. (A) campo claro e (B) campo escuro. Aumento de 200x.



A alteração da forma dos cristais após autoclavação pode decorrer da dissolução parcial, seguida por um processo de reprecipitação, que contribuiu para o crescimento das regiões cristalinas. Assim, os agregados observados após a esterilização podem ser resultantes de processos de reprecipitação, nos quais podem ocorrer interações químicas entre os cristais (SANTOS *et al.*, 2012).

Um outro ponto a ser destacado a respeito da formulação **GT109** é a avaliação da dose segura dos excipientes utilizados em sua produção. No caso do X1, X8 e o X11, as considerações são as mesmas anteriormente feitas para a formulação **GT64**, visto que as concentrações desses excipientes foram mantidas. Com relação ao X10 e ao X2, as concentrações utilizadas são inferiores às concentrações consideradas tóxicas (ROWE *et al.*, 2009).

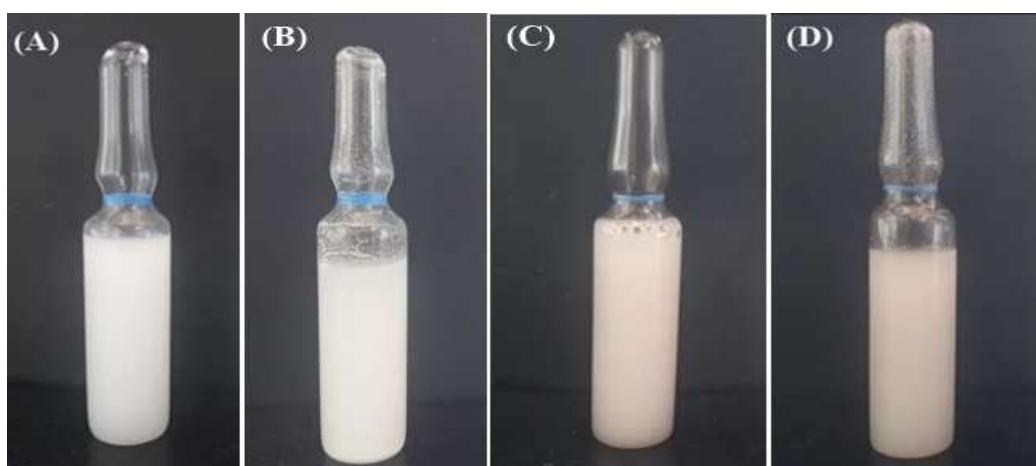
### **5.8 Esterilização das formulações GT64 e GT109 por radiação gama**

Além da otimização da formulação **GT64**, também avaliamos outro método de esterilização. A esterilização por radiação gama é utilizada como padrão internacional e a sua utilização vem apresentando uma maior aplicação nos processos nacionais. O método de esterilização em questão ocorre por meio da exposição dos produtos à ação de ondas eletromagnéticas curtas, as quais são geradas a partir de fontes de Cobalto 60 e Césio 137, destacando-se que o ambiente onde ocorre o processo de esterilização deve ser especialmente preparado para esse procedimento (DA SILVA *et al.*, 2014).

A **Figura 17** ilustra a aparência macroscópica das formulações **GT64** e **GT109** antes e após a esterilização por radiação. É possível observar que ambas as formulações mantiveram o aspecto pré-esterilização. Novamente, a formulação **GT64** apresenta uma menor quantidade de partículas aderidas à parede da ampola, além de apresentar uma maior facilidade de ressuspensão. Um outro aspecto que pode ser observado visualmente é a alteração da coloração da ampola, de transparente para âmbar. Essa alteração de coloração ocorre devido ao aumento da densidade ótica do vidro decorrente da dose de radiação absorvida (RODRIGUES & CALDAS, 2002).

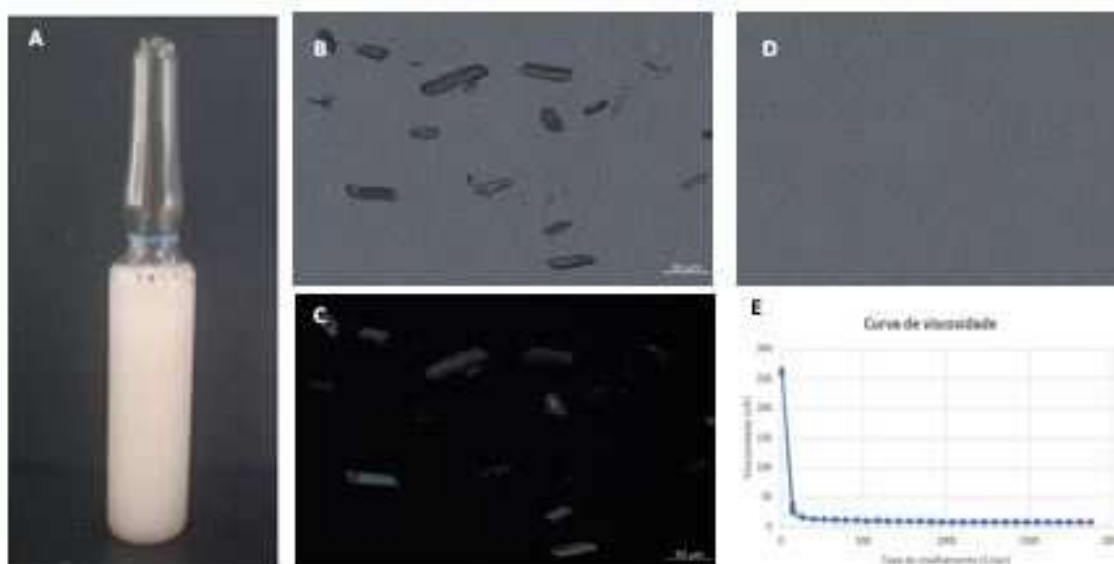


**Figura 17:** (A) Formulação **GT64** e (B) **GT109** antes da irradiação, (C) Formulação **GT64** e (D) **GT109** após irradiação.

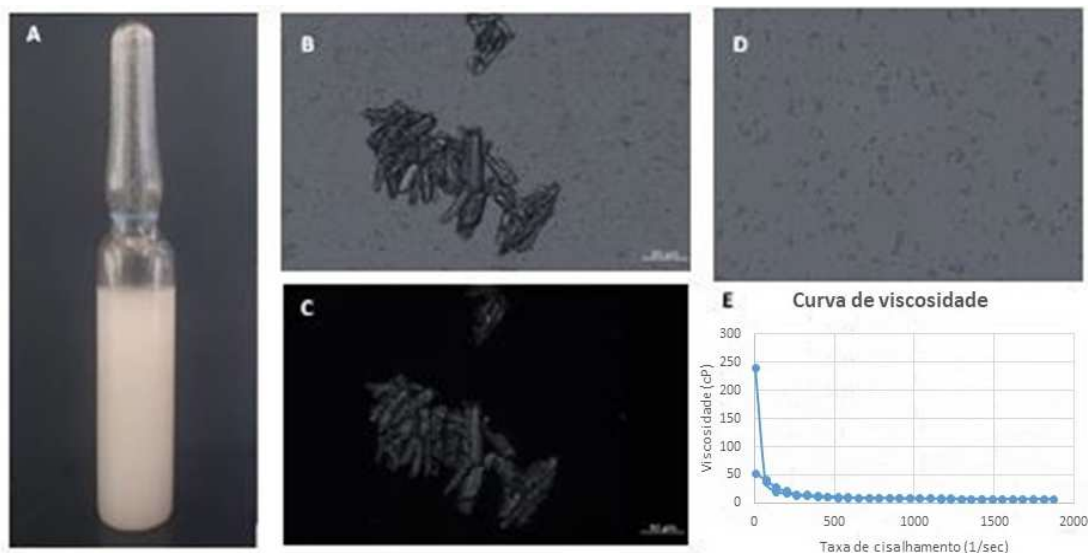


A **Figuras 18 e 19** ilustram os resultados obtidos nas análises de caracterização das formulações **GT64** e **GT109** pós-irradiação.

**Figura 18:** Caracterização da formulação **GT64** após irradiação. (A) Aspecto macroscópico da **GT64**; (B) Imagem de microscopia de luz polarizada da **GT64** em campo claro; (C) e Imagem de microscopia de luz polarizada da **GT64** em campo escuro (presença dos cristais de itraconazol em suspensão). (D) Imagem de microscopia de luz polarizada do placebo da **GT64** em campo claro, onde é possível observar a presença de uma matriz polimérica (aumento de 200x); (E) Curva de viscosidade da **GT64**.



**Figura 19:** Caracterização da formulação **GT109** após esterilização. (A) Aspecto macroscópico da **GT109**; (B) Imagem de microscopia de luz polarizada da **GT109** em campo claro; (C) e Imagem de microscopia de luz polarizada da **GT109** em campo escuro (presença dos cristais de itraconazol em suspensão). (D) Imagem de microscopia de luz polarizada do placebo da **GT109** em campo claro, onde é possível observar a presença de bolhas (aumento de 200x); (E) Curva de viscosidade da **GT109**.



Assim como na formulação **GT64** não esterilizada (**Figuras 10B e C**), é possível observar a presença de cristais de ITZ em suspensão e de uma “matriz” polimérica estabilizando os cristais, a qual é mais facilmente observada na formulação placebo (**Figura 10D**). A formulação **GT109** (**Figuras 15B e C**) após a esterilização por radiação gama, também não apresentou alteração no formato dos cristais de ITZ, bem como no aspecto geral, diferentemente do que foi observado após esterilização por autoclavação (**Figura 16**). A **Tabela 15** ilustra os valores de pH obtidos para as formulações **GT64** e **GT109**, e seus respectivos placebos, pré e pós-irradiação gama. Não houve diferença estatística no pH das formulações avaliadas, ou seja, para ambas formulações (**GT64** e **GT109**) não houve diferença em relação aos seus respectivos placebos ou em relação à radiação ( $p > 0,05$ ).

As **Figuras 18E** e **19E** ilustram o perfil reológico das formulações **GT64** e **GT109**, respectivamente, após a esterilização por radiação gama. Como é possível observar, os perfis reológicos mantiveram semelhantes aos perfis obtidos antes do processo de esterilização por radiação gama.

**Tabela 15:** Valores de pH obtidos para as formulações **GT64** e **GT109**, e seus respectivos placebos, antes e após a esterilização por radiação gama. Não houve diferença estatísticas entre os valores de pH apresentados ( $p > 0,05$ ).

Formulações	pH (n=3)
<b>GT64</b> (pré-irradiação)	3,04 ± 0,096
<b>PGT64</b> (pré-irradiação)	2,99 ± 0,010
<b>GT64</b> (pós-irradiação)	3,11 ± 0,155
<b>PGT64</b> (pós-irradiação)	3,02 ± 0,026
<b>GT109</b> (pré-irradiação)	2,99 ± 0,034
<b>PGT109</b> (pré-irradiação)	3,03 ± 0,008
<b>GT109</b> (pós-irradiação)	3,04 ± 0,037
<b>PGT109</b> (pós-irradiação)	3,04 ± 0,008

A **Tabela 16** ilustra a faixa de tamanhos obtida para as partículas das formulações **GT64** e **GT109** pré e pós-irradiação. Como pode ser observado, para a formulação **GT64** foi observado um aumento do tamanho das partículas após a irradiação (Dx 90 de 39,6 µm para 54,8 µm). Embora em menor proporção, também observamos um comportamento semelhante para a formulação **GT109** (Dx 90 de 51,35 µm para 55,75 µm).

**Tabela 16:** Faixa de tamanhos obtida para as partículas das formulações **GT64** e **GT109** pré e pós-irradiação.

Formulação/Placebo	Dx (10)	Dx (50)	Dx (90)
<b>GT64</b> (pré-irradiação)	6,85 µm	22,7 µm	39,6 µm
<b>GT64</b> (pós-irradiação)	7,99 µm	25,5 µm	54,8 µm
<b>GT109</b> (pré-irradiação)	1,34 µm	15,8 µm	51,35 µm
<b>GT109</b> (pós-irradiação)	0,362 µm	18,8 µm	55,75 µm

A **Tabela 17** apresenta os valores de osmolaridade obtidos no osmômetro criométrico para as formulações pré e pós esterilização por radiação gama. Como pode ser observado, não houve diferença entre os valores pré e pós irradiação da formulação **GT64** e seu respectivo placebo, pré e pós-irradiação ( $p > 0,05$ ). No entanto, os valores de osmolaridade encontrados para a formulação **GT64** foram estatisticamente diferentes dos valores encontrados para a formulação **GT109** e

seu respectivo placebo, pré e pós-irradiação ( $p < 0,05$ ). Também foi possível observar diferença estatística entre a formulação **GT109** pré-irradiada e seu placebo pré e pós-irradiado ( $p < 0,05$ ). No entanto, os valores de osmolaridade da formulação **GT109** irradiado não foram diferentes estatisticamente dos encontrados para seu placebo irradiado. O conjunto desses dados fornece um indício da adequabilidade da esterilização da radiação gama para ambas formulações desenvolvidas. Porém, apenas para a **GT64** não foi observada nenhuma diferença estatística em relação ao seu placebo e à radiação ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 17:** Valores de osmolaridade (cálculo teórico e medição em osmômetro criométrico).

Formulação/placebo	Osmômetro criométrico (n=3)
<b>GT64</b> (pré-irradiação)	0,795 ± 0,005 <sup>a</sup>
<b>GT64</b> (pós-irradiação)	0,804 ± 0,007 <sup>a</sup>
<b>PGT64</b> (pré-irradiação)	0,792 ± 0,004 <sup>a</sup>
<b>PGT64</b> (pós-irradiação)	0,789 ± 0,000 <sup>a</sup>
<b>GT109</b> (pré-irradiação)	1,396 ± 0,009 <sup>b</sup>
<b>GT109</b> (pós-irradiação)	1,359 ± 0,007 <sup>b,d</sup>
<b>PGT109</b> (pré-irradiação)	1,315 ± 0,000 <sup>c</sup>
<b>PGT109</b> (pós-irradiação)	1,328 ± 0,005 <sup>c,d</sup>

\*Letras diferentes refletem diferenças estatísticas entre os valores apresentados ( $p < 0,05$ ).

A **Tabela 18** ilustra os resultados de teor e impurezas das formulações **GT64** e **GT109** após o processo de esterilização por irradiação. Como pode ser observado, a irradiação levou à um leve decaimento do teor do ITZ. Mas, o perfil de substâncias relacionadas (impurezas) não aumentou proporcionalmente. Nas amostras não irradiadas, não há identificação de impurezas. Já nas amostras irradiadas, observamos a presença de impureza, identificada como RRT~0,933, a qual se encontra abaixo do limite para impurezas desconhecidas (0,2%). Além da impureza citada anteriormente, o perfil cromatográfico das amostras irradiadas apresenta outras impurezas abaixo do limite de notificação.

**Tabela 18:** Teor e impurezas das formulações **GT64** e **GT109** (pré e pós-irradiação).

Teste	Formulação	Resultado (%)	
		Não irradiada	Irradiada
Doseamento	<b>GT64</b>	100,25	95,43 (decaimento: 4,82%)
	<b>GT109</b>	95,20	93,58 (decaimento: 1,62%)

**Tabela 18:** Teor e impurezas das formulações **GT64** e **GT109** (pré e pós-irradiação) (continuação).

Teste	Formulação	Resultado (%)	
		Não irradiada	Irradiada
Substâncias Relacionadas	GT64	0,00	0,16
	GT109	0,00	0,15

Correlacionando esses resultados com os obtido no estudo de estresse, especificamente na condição de fotólise (exposição à luz por 168h, tópico 5.4) observamos que, para a formulação **GT64**, um comportamento de redução do teor e aumento de substâncias relacionadas semelhante, haja vista que o decaimento de teor na fotólise foi de 8,46%, e a formação de impurezas foi de 0,62%. Entre essas impurezas, foi detectada uma impureza identificada por RRT~0,931, com valor próximo a 0,15%. Para a formulação **GT109**, o decaimento do teor e aumento de substâncias relacionadas, 1,62% e 4,82 %, respectivamente, foi inferior ao observado para a formulação **GT64**. Mas, para a formulação **GT109**, não foi realizado o estudo de degradação forçada. A **Figura 20** ilustra os cromatogramas das formulações **GT64** e **GT109** não-irradiadas e irradiadas, respectivamente, na concentração de 100 µg/mL. No **ANEXO X** está disponível o compilado dos resultados obtidos na avaliação de teor e substâncias relacionadas para ambas as formulações, pré e pós-irradiação.

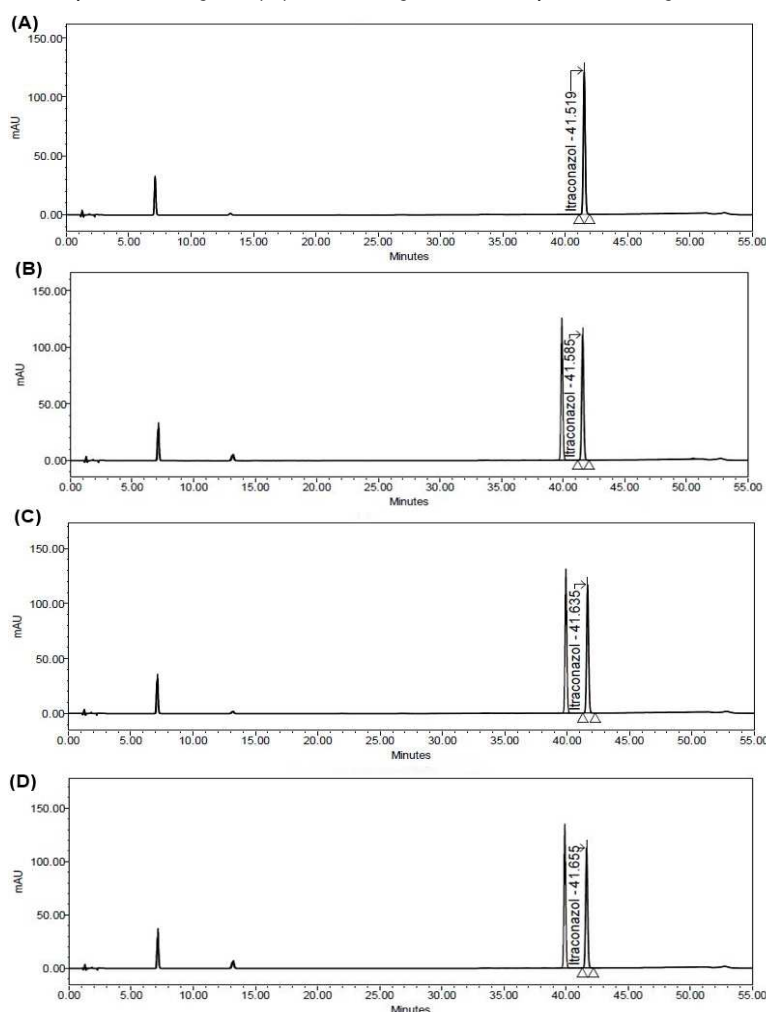
Como a formulação **GT64** foi a selecionada para o estudo clínico, repetimos a análise de comparação da formulação pré e pós-irradiação com um n= 3 (**Tabela 19**). Como pode ser observado, não há diferença estatística entre o teor pré e pós-irradiação ( $p= 0,2807$ ), fornecendo um indício da adequabilidade da esterilização por radiação.

**Tabela 19:** Teor da formulação **GT64** pré e pós-irradiação.

Formulação	% de itraconazol		
não irradiada	93,5	100,25	95,2
irradiada	90,92	95,43	93,58

\*Não há diferença estatística entre as amostras pré e pós-irradiação ( $p= 0,2807$ ).

**Figura 20:** Cromatogramas das formulações **GT64** e **GT109** (pré e pós-irradiação). (A) Formulação **GT64** pré-irradiação. (B) Formulação **GT64** pós-irradiação. (C) Formulação **GT109** pré-irradiação. (D) Formulação **GT109** pós-irradiação.



## 5.9 Estudo clínico em gatos com esporotricose

### 5.9.1 Casuística

Dos animais avaliados, sete eram machos (70%) e três eram fêmeas (30%). A idade dos animais variou entre 6 meses e 6 anos e o peso entre 0,9 e 4,7 kg, sendo importante destacar que as doses administradas respeitavam os critérios de segurança definidos previamente (**Tópico 5.1.3**), tanto para o ITZ quanto para os excipientes, levando-se em conta o peso dos animais.

Antes da primeira administração da formulação **GT64**, os animais apresentavam lesões distribuídas da seguinte forma:

- seis animais (60%) apresentavam concomitantemente lesões cutâneas e aumento do volume do focinho;
- quatro animais (40%) apresentavam como manifestação da esporotricose apenas o aumento do volume do focinho;
- todos os animais apresentavam lesões localizadas na cabeça, principalmente no plano nasal (100%), orelha direita (20%), orelha esquerda (30%), face (10%);
- 5 animais (50%) apresentavam lesões nas patas (50%).

Importante destacar que, em mais de um momento do estudo, todos os animais do ambiente, tanto os animais que não faziam parte do estudo quanto os que faziam, apresentaram sinais de rinotraqueíte. A rinotraqueíte é uma doença que se assemelha à gripe humana e pode causar sinais e sintomas, como espirros, secreções oculares e nasais, dispneia, letargia, inapetência, acometimentos oculares (GOULD, 2011). Esse quadro dificultou a diferenciação entre os sinais e sintomas da esporotricose e da rinotraqueíte felina.

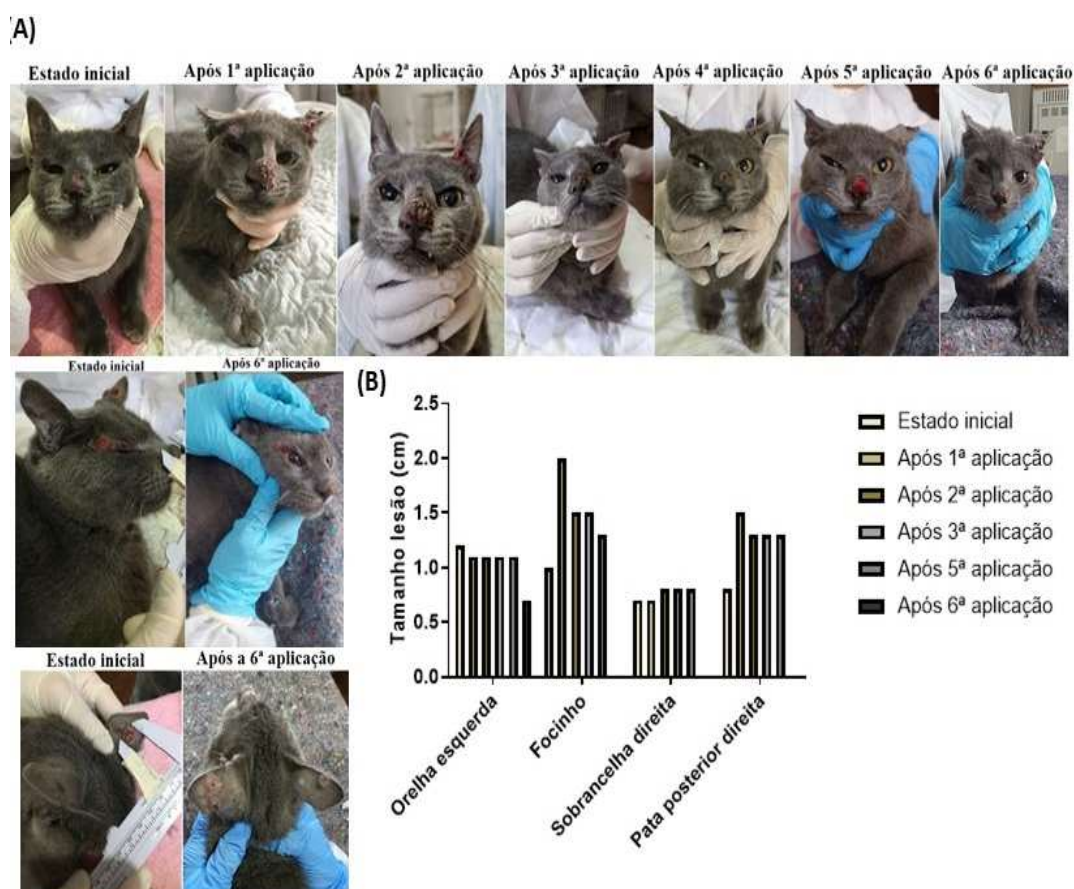
Ao longo do estudo foram realizadas medições das lesões dos animais em tratamento. Porém, não foi possível realizar as medições de todas as lesões em todas as visitas, principalmente devido ao fato do número restrito de profissionais disponíveis para a medição, sendo priorizadas a retirada de amostras para avaliação laboratorial e o registro fotográfico.

O tratamento foi realizado somente com a formulação denominada **GT64**, por ter apresentado um melhor perfil de ressuspensão dos cristais de ITZ quando comparada à formulação **GT109**, bem como osmolaridade. Ao longo do trabalho, 10 animais foram submetidos ao tratamento com formulação **GT64**, sendo a evolução do quadro dos animais descrita abaixo:

- Felino 01 (Clara): foi observado aumento das articulações de todas as patas após a 1ª aplicação (2,8 cm), mas que diminuiu progressivamente (1,1 cm), embora não tenha voltado ao normal até o ponto de corte. Após a 1ª e 2ª aplicações, também observamos aumento dos linfonodos dos membros posteriores e submandibulares, respectivamente. O aumento nas articulações e nos linfonodos foi acompanhado a cada aplicação. Na 5ª aplicação, o linfonodo da pata traseira esquerda já não se

encontrava mais aumentado, mas os submandibulares e da pata traseira direita, que foi a que mais recebeu as aplicações, continuaram aumentados até a data de corte do estudo. Ao todo foram seis aplicações de 2 mL. Com relação às lesões, localizadas principalmente na face, focinho e orelhas, foi observada uma piora no aspecto visual entre a 2ª e 4ª aplicação. No entanto, a partir da 5ª aplicação todas as lesões apresentaram melhora (**Figura 21A**), embora nem todas tenha diminuído de tamanho em relação ao tempo zero (**Figura 21B**). Não foi observada diferenças estatísticas entre as medições realizadas nas lesões até o ponto de corte para compilação dos resultados ( $p > 0,05$ ).

**Figura 21:** Evolução das lesões do felino 01 (Clara) no decorrer do tratamento com a formulação **GT64**. A- Aspecto visual das lesões. B- Medida das lesões. Obs.: Não houve medição das lesões após a 4ª aplicação, e após a 6ª aplicação somente a lesão da orelha esquerda foi medida. Assim, para esses tempos foi realizado apenas o registro fotográfico. Não houve diferença estatística no tamanho das lesões ao longo do tratamento ( $p > 0,05$ ).

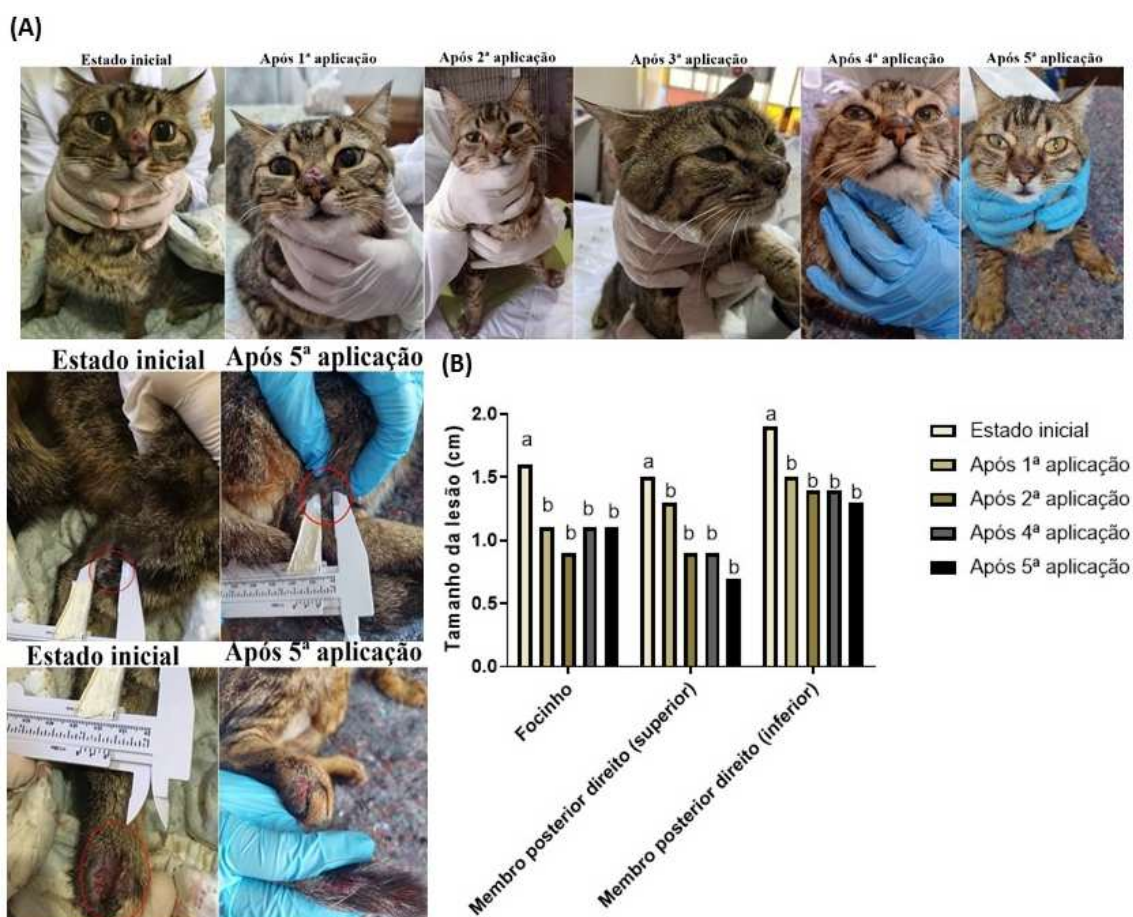


- Felino 02 (Tigrado): após a 1ª aplicação, observamos o aparecimento de uma lesão na ponta da cauda, caracterizada pela perda de pelo no local. Mas, na 3ª



aplicação a lesão já estava cicatrizada. Ao longo do estudo o animal apresentou melhora no aspecto visual da lesão do focinho, principal manifestação, embora sem diminuição no tamanho da lesão. Ao todo foram cinco aplicações de 2mL. A **Figura 22** ilustra a evolução do animal ao longo do tratamento. Como pode ser observado, houve redução significativa ( $p < 0,05$ ) para todas as lesões e relação ao início do estudo. No entanto, não houve redução significativa no tamanho das lesões ao longo do tempo avaliado ( $p > 0,05$ ).

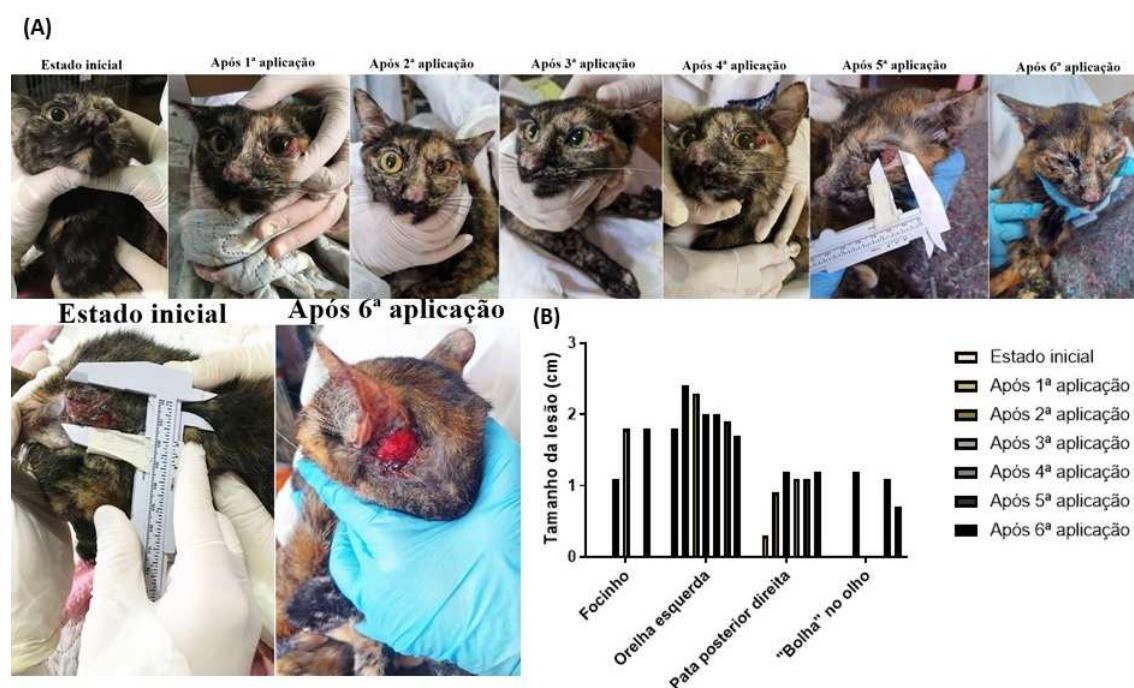
**Figura 22:** Evolução das lesões do felino 02 (Tigrado) no decorrer do tratamento com a formulação **GT64**. A- Aspecto visual das lesões. B- Medida das lesões. Obs.: Não houve medição das lesões após a 3ª aplicação, sendo realizado apenas o registro fotográfico. Letras diferentes indicam diferença estatística entre as medições das lesões ( $p > 0,05$ ). Dados transformados ( $Y=Y^2$ ) para atender as premissas de normalidade (Shapiro-Wilk) e homoscedasticidade (Spearman). Gráfico apresentado com os dados originais.



- Felino 03 (Jane): a lesões na pata posterior direita e a bolha no olho somente apareceram após a 1ª aplicação, e a lesão no focinho após a 2ª aplicação. Como o quadro do animal apresentava pouca melhora no aspecto visual e diminuição de

tamanho, na 6ª aplicação optou-se por aumentar a dose, sendo aplicados 2 mL em cada pata posterior. Ao todo foram sete aplicações. A **Figura 23** ilustra a evolução do animal ao longo do tratamento. Não houve diferença estatística em nenhuma das lesões ao longo do tratamento ( $p > 0,05$ ), sendo possível observar uma leve redução no tamanho da bolha do olho entre o estado inicial e a 6ª aplicação. Para o restante das lesões houve uma estabilização, sem melhora no aspecto ou medição.

**Figura 23:** Evolução das lesões do felino 03 (Jane) no decorrer do tratamento com a formulação GT64. A- Aspecto visual das lesões. B- Medida das lesões. As lesões na pata posterior direita e a bolha no olho somente apareceram após a 1ª aplicação, e a lesão no focinho após a 2ª aplicação. Não foram realizadas medições no focinho após a 4ª e 6ª aplicações, e na bolha no olho após a 3ª e 4ª aplicações. Não houve diferença estatística no tamanho das lesões ao longo do tratamento ( $p > 0,05$ ).



- Felino 04 (Jolie): este animal recebeu apenas duas aplicações de 2 mL, pois entrou no estudo próximo à data de corte para compilação dos resultados. Após a 1ª e 2ª aplicação foi observada uma piora no aspecto visual das lesões, localizadas principalmente no focinho, orelha direita e nas patas traseiras. A **Figura 24** ilustra a evolução do animal durante a condução do estudo. Para este animal não foram realizadas medidas das lesões, apenas o registro fotográfico.

**Figura 24:** Evolução das lesões do felino 04 (Jolie) no decorrer do tratamento com a formulação GT64.



- Felino 05 (Romeu): após a 1ª aplicação observamos uma lesão na pata que recebeu a aplicação. Para avaliar se a lesão havia sido decorrente da aplicação, a 2ª aplicação foi realizada na outra pata posterior. Após a 2ª aplicação, não apareceram novas lesões e houve melhora da lesão que havia aparecido na outra pata. Importante destacar que, entre a 2ª e a 3ª aplicação foi utilizado também o ITZ tópico na lesão localizada na orelha esquerda, sendo essa formulação também desenvolvida no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da UFMG. As demais lesões do animal, localizadas principalmente na orelha esquerda e no focinho, não apresentaram melhora significativa no aspecto visual. Ao todo foram seis aplicações de 2 mL. A **Figura 25** ilustra a evolução do animal ao longo do tratamento. Não houve diferença estatística nas medidas realizadas nas lesões ao longo do tratamento ( $p > 0,05$ ).

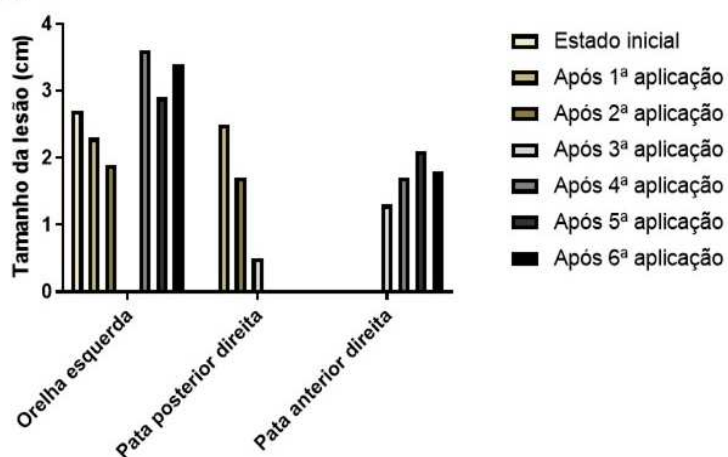
**Figura 25:** Evolução das lesões do felino 05 (Romeu) no decorrer do tratamento com a formulação

**GT64.** A- Aspecto visual das lesões. B- Medida das lesões. Obs.: As lesões na pata posterior direita e na pata anterior direita somente surgiram, respectivamente, após a 1ª e 3ª aplicações. Não foi realizada medição na lesão da orelha esquerda após a 3ª aplicação. Não foram realizadas medições na lesão da pata posterior direita após a 3ª aplicação devido a cura clínica da lesão. Não houve diferença estatística no tamanho das lesões ao longo do tratamento ( $p > 0,05$ ).

(A)



(B)



- Felino 06 (Salomão): a principal manifestação da esporotricose neste animal foi o inchaço no focinho. Após a 1ª, 2ª e 3ª aplicações observamos diminuição progressiva do tamanho do focinho. Mas, após a 4ª aplicação, o focinho aumentou de tamanho e manteve aumentado até a data de corte. Ao todo foram seis aplicações de 2 mL. A **Figura 26** ilustra a evolução do animal ao longo do tratamento. A lesão no focinho não foi medida durante a realização do estudo, sendo realizados apenas registros fotográficos.

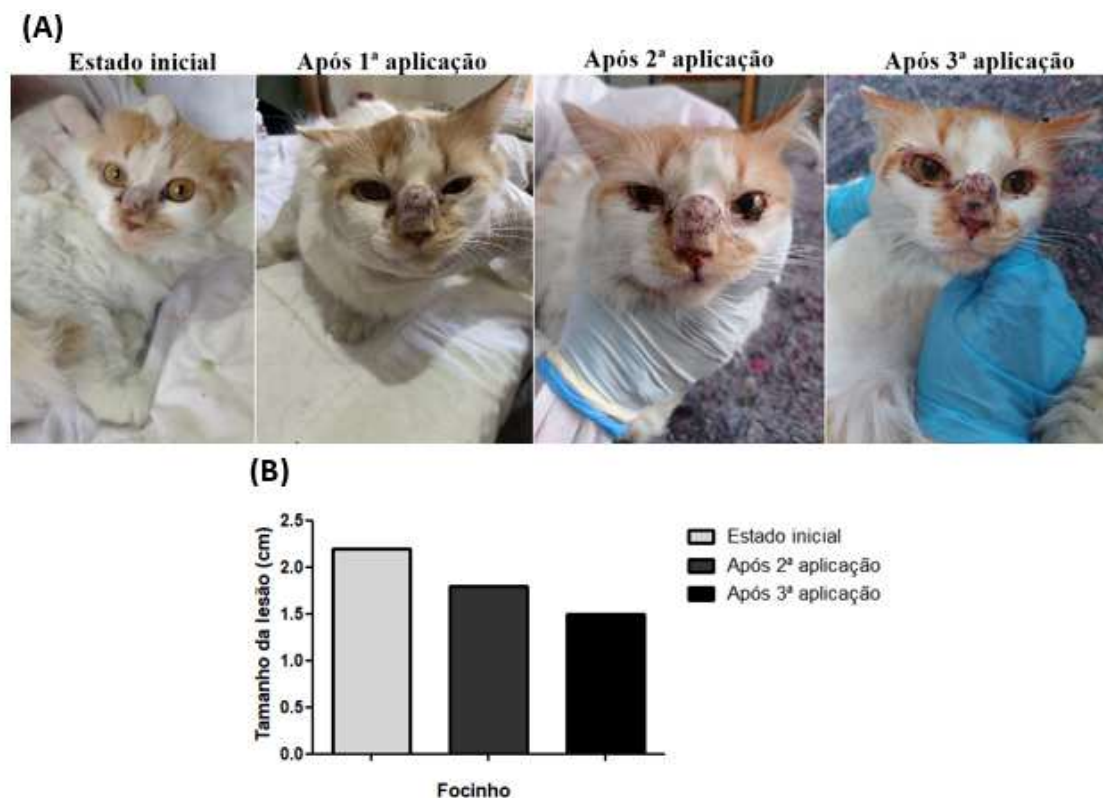
**Figura 26:** Evolução da lesão do felino 06 (Salomão) no decorrer do tratamento com a formulação **GT64**. \*Obs: não foi incluída foto após a 3ª aplicação por não permitir a adequada visualização da lesão.



- Felino 07 (Tico): após a 1ª aplicação o animal apresentou uma lesão supurada próxima ao local de aplicação, sendo suspensa a aplicação da formulação e iniciado o tratamento com outras medicações.

- Felino 08 (Bitoca): a principal manifestação da esporotricose neste animal foi o aumento do focinho. Entre a 2ª e 3ª aplicação houve redução do tamanho do focinho. Ao todo foram três aplicações de 2 mL. A **Figura 27** ilustra a evolução do animal durante o tratamento. Devido ao número limitado de medidas, não foi possível realizar a avaliação estatística. Porém, como pode ser observado na figura, houve uma redução de aproximadamente 32% no tamanho da lesão entre o estado inicial e a 3ª aplicação.

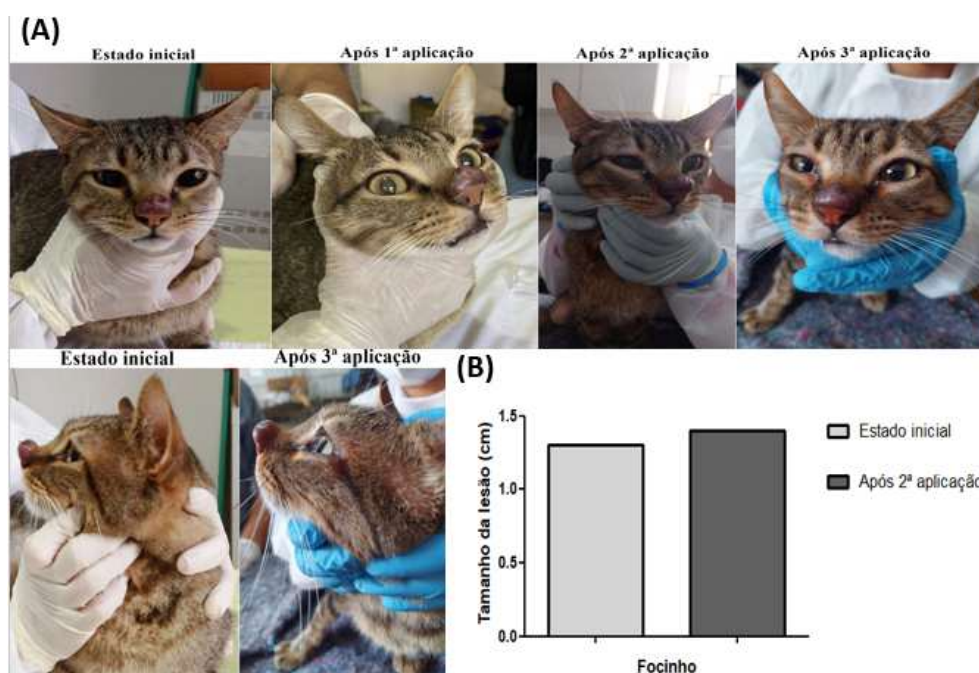
**Figura 27:** Evolução da lesão do felino 08 (Bitoca) no decorrer do tratamento com a formulação **GT64**. A- Aspecto visual das lesões. B- Medida das lesões. Obs.: Não foi realizada a medição da lesão após a 1ª aplicação. Devido ao número limitado de medidas, não foi possível realizar a avaliação estatística. Porém, houve uma redução de aproximadamente 32% no tamanho da lesão entre o estado inicial e a 3ª aplicação.



- Felino 09 (Magno): a principal manifestação da esporotricose neste animal foi o aumento do focinho. Após a 1ª aplicação, abriu-se uma ferida na ponta do focinho do animal, que cicatrizou após as aplicações seguintes. No entanto, não observamos melhora no tamanho do focinho do animal. Até a data de corte o animal recebeu três aplicações de 2 mL. A **Figura 28** ilustra a evolução do animal ao longo do tratamento. Devido ao número limitado de medidas, não foi possível realizar a avaliação estatística. Porém, como pode ser observado na figura, houve um aumento de aproximadamente 7% no tamanho da lesão do focinho entre o estado inicial e a 2ª aplicação.

**Figura 28:** Evolução da lesão do felino 09 (Magno) no decorrer do tratamento com a formulação **GT64**. A- Aspecto visual das lesões. B- Medida das lesões. Obs.: Não foi realizada a medição da lesão após a 1ª e 4ª aplicações. Devido ao número limitado de medidas, não foi possível realizar a

avaliação estatística. Porém, houve um aumento de aproximadamente 7% no tamanho da lesão entre o estado inicial e a 2ª aplicação.



- Felino 10 (Bonitinho): a principal manifestação da esporotricose neste animal foi o aumento do focinho. Após a 1ª aplicação, o focinho apresentou uma melhora visual. Até a data de corte este animal recebeu uma aplicação de 2 mL. A **Figura 29** ilustra a evolução do animal ao longo do tratamento. A lesão do foi acompanhada apenas por meio de registro fotográfico, sem a medição da lesão.

**Figura 29:** Evolução da lesão do felino 10 (Bonitinho) no decorrer do tratamento com a formulação GT64.



Ao avaliarmos os resultados obtidos na avaliação clínica, que podem ser visualizados por meio das imagens fotográficas dos animais, e na medição das lesões é possível observar que, nem sempre a diminuição da lesão acompanhou a melhora do aspecto das lesões e vice-versa. De modo geral, pôde-se observar também a melhora no aspecto e/ou diminuição da maioria das lesões avaliadas, sendo observados os melhores resultados principalmente nas lesões descritas como “aumento do focinho”, destacando-se os felinos denominados Bonitinho, Bitoca, Salomão, Tigrado e Clara.

### 5.9.2 Características laboratoriais

A **Figura 30** ilustra os resultados obtidos na avaliação do perfil bioquímico dos felinos do estudo a partir de amostras coletadas nos dias 12/09/2022 e 13/10/2022. É importante destacar que, na segunda avaliação do perfil bioquímico dos felinos, realizado no dia 13/10/2022, não foi possível realizar a repetição dos exames para todos os animais.

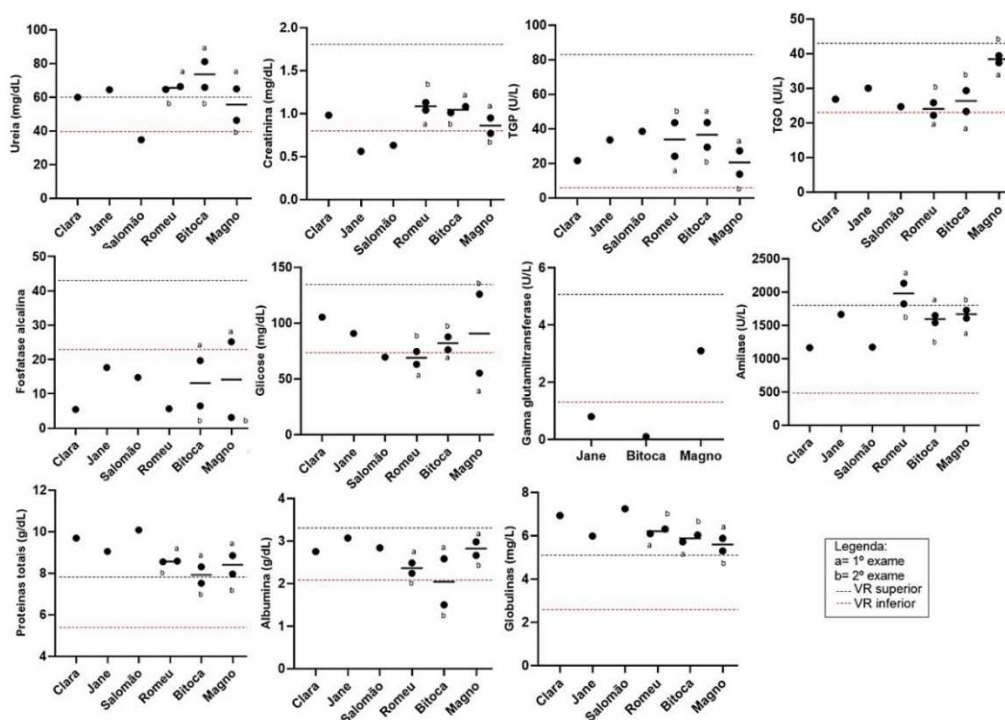
Comparando-se o perfil bioquímico dos animais que estavam em um pior estado clínico, aproximadamente 33%, os quais foram menos responsivos ao tratamento, com os animais que apresentavam melhora ou estabilidade no estado clínico (aproximadamente 67%), não foi possível observar alterações que pudessem ser correlacionadas especificamente com o quadro clínico. De maneira geral, quase a totalidade dos animais apresentaram alterações nos valores de referência para a ureia, a alanina aminotransferase (TGP), fosfatase alcalina, proteínas totais e globulinas.

As proteínas séricas variam amplamente em tamanho, estrutura e função, sendo que o valor da proteína total pode ser afetado por fatores fisiológicos e patológicos (TOTHOVA *et al.*, 2016). Importante destacar que, para o felino denominado Romeu, foram observados sinais de desidratação, sendo necessária a administração de soro. A ocorrência de desidratação pode causar aumento das proteínas totais no organismo, uma vez que, em um menor volume de sangue circulante, as proteínas ficam mais concentradas (LACVET, 2022). Adicionalmente, a presença de desidratação também propicia valores de ureia aumentados, como pode ser observado nos exames da maioria dos animais (aproximadamente 67%).



O aumento de proteínas totais também pode ocorrer devido ao aumento das globulinas (observado em 100% dos animais), as quais podem estar associadas com respostas inflamatórias, injúrias teciduais e/ou presença de corpos estranhos no organismo (MEYER & HARVEY, 2004). Já a fosfatase alcalina baixa, que se apresentou alterada em aproximadamente 83% dos animais, pode ser relacionada à anemia e deficiências nutricionais (HUNT *et al.*, 2014). Os demais parâmetros bioquímicos avaliados apresentaram-se, de modo geral, dentro dos respectivos valores de referência.

**Figura 30:** Perfil bioquímico dos felinos em tratamento com a formulação **GT64**.



\*VR= valor de referência. TGP: alanina aminotransferase, TGO: asparto aminotransferase.

Na **Figura 31** estão ilustrados os resultados do hemograma dos felinos obtidos das amostras coletadas nos dias 12/09/2022 e 11/10/2022. É importante destacar que, na segunda avaliação do hemograma dos felinos (realizado no dia 11/10/2022), não foi possível realizar a repetição dos exames para todos os animais.

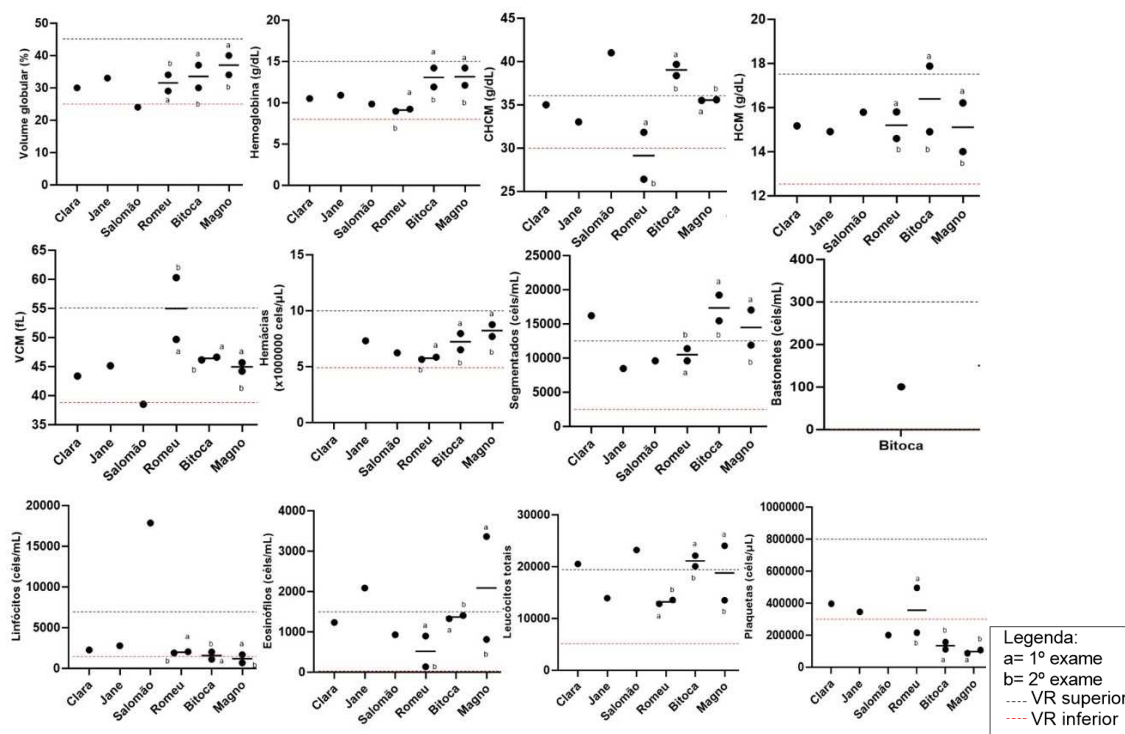
Como pode ser observado, para a maioria dos animais que apresentaram um estado clínico mais estável, ou melhora após o início do tratamento com a formulação **GT64** (aproximadamente 67%), foram detectados valores de leucócitos totais e/ou segmentados acima dos valores de referência. Uma vez que os leucócitos são células especializadas em defender o corpo contra organismos

estranhos, esse aumento pode indicar uma resposta imunológica mais eficiente por parte dos animais, contribuindo para o melhor estado clínico dos mesmos.

Uma outra observação interessante referente aos felinos que apresentaram um estado clínico estável ou melhorado é a presença de valores de plaquetas reduzidos (50% dos animais). Ao reagir de forma exacerbada à uma infecção, o organismo pode produzir anticorpos que se ligam às plaquetas, marcando-as como “estranhas”, o que acarreta na remoção dessas plaquetas do organismo (MIDDLETON & RONDINA, 2016).

Um outro motivo que pode ter ocasionado a queda das plaquetas é o estresse no momento da coleta, já que o estresse pode levar ao sequestro de plaquetas pelo baço, causando uma trombocitopenia transitória (FERREIRA NETO *et al.*, 1981). Essa hipótese poderia explicar a queda no número de plaquetas e a observação de agregados plaquetários em aproximadamente 83% dos animais. Os demais parâmetros hematológicos avaliados apresentaram-se, de modo geral, dentro dos respectivos valores de referência.

**Figura 31:** Hemograma dos felinos em tratamento com a formulação GT64.



\*VR= valor de referência. CHCM: Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média, HCM: Hemoglobina Corpuscular Média, VCM: Volume Corpuscular Médio.

### *5.9.3 Desfecho do estudo clínico*

Durante a condução do estudo clínico até o ponto de corte para compilação dos resultados, nenhum dos animais avaliados obteve cura clínica e um dos animais (10%) não prosseguiu no estudo devido ao agravamento do quadro clínico. Destaca-se que nenhum dos animais tratados veio a óbito durante o tratamento com a formulação. Com o objetivo de avaliar melhor a eficácia e segurança da formulação em estudo, e tendo em vista que o tratamento da esporotricose é usualmente longo, este estudo continua em andamento. A respeito do desfecho do tratamento dos animais, é importante ressaltar que os animais em estudo (assim como os demais animais do ambiente da ONG), apresentaram outros quadros de saúde, como a rinotraqueíte e a presença de pulgas, o que pode ter influenciado na evolução clínica dos animais no âmbito do tratamento da esporotricose com a formulação proposta. Um outro ponto a ser destacado é de que a formulação proposta é inédita, não existindo no mercado uma formulação a base de ITZ para aplicação subcutânea. Assim, ajustes, como definição do intervalo entre doses e volume injetado, ainda se encontram em processo de padronização.

## 6 CONCLUSÃO

Tendo-se em vista os objetivos definidos para o presente projeto de pesquisa, ao final do trabalho foi possível cumpri-los. Uma extensa revisão da literatura e triagem de diferentes excipientes aprovados para uso parenteral na medicina veterinária propiciou o desenvolvimento das suspensões de ITZ, sendo utilizados os excipientes mais promissores na avaliação da solubilidade mínima do ITZ. As suspensões injetáveis de ITZ desenvolvidas foram caracterizadas através de análises macro e microscópicas, perfil reológico, osmolaridade, tamanho das partículas e teor de ITZ por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), tendo-se como resultado suspensões turvas, facilmente ressuspendíveis, com comportamento não-Newtoniano pseudoplástico. Na formulação **GT64** foi possível observar a presença de uma “matriz” polimérica estabilizando os cristais de ITZ (D90: 39,6  $\mu\text{m}$ ) e a osmolaridade foi de  $0,795 \pm 0,005$  Osm/Kg. Já na formulação **GT109** não foi possível observar a presença de uma “matriz” polimérica e os cristais de ITZ apresentaram D90 de 51,35  $\mu\text{m}$  e  $1,396 \pm 0,009$  Osm/Kg de osmolaridade. É válido ressaltar que o método analítico desenvolvido se mostrou adequado para avaliação do perfil de impurezas e do teor de ITZ em ambas as formulações desenvolvidas. Dois métodos de esterilização também foram avaliados, calor úmido e radiação gama, propiciando a esterilização terminal das suspensões desenvolvidas. Por fim, os resultados obtidos no estudo clínico até o momento forneceram evidências do potencial da formulação em contribuir para o tratamento da esporotricose felina.

## REFERÊNCIAS

- AGENER, UNIÃO SAÚDE ANIMAL. Agemoxi. Disponível em: <[https://agener.com.br/wp-content/uploads/2021/01/4023164-Agemoxi\\_compressed.pdf](https://agener.com.br/wp-content/uploads/2021/01/4023164-Agemoxi_compressed.pdf)>. Acesso em: 26 de dezembro de 2021.
- ALAM, S.; IGBAL, Z.; ALI, A.; KHAR, R.K.; AHMAD, J.; AKHTER, S.; TALEGAONKAR, S. Microemulsion as a Potential Transdermal Carrier for Poorly Water Soluble Antifungal Drug Itraconazole. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 31:84–94, 2010.
- ALI, H.S.; SULIMAN, R.S.; ELHAJ, B.M.A.; SULIMAN, R. Pharmaceutical Powder Dosage Forms: A Review. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 11(1): 20-22, 2019.
- ALMEIDA, A. J; REIS, N. F.; LOURENÇO, C. S.; COSTA, N. Q.; BERNARDINO, M. L. A.; MOTTA, O. V. Esporotricose em felinos domésticos (*Felis catus domesticus*) em Campos dos Goytacazes. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v. 38, n. 7, p.1438-1443, 2018.
- ALMEIDA, L.G.F., ALMEIDA, V. G. F. Uma revisão interdisciplinar da esporotricose. *Revista Eletrônica Estácio Saúde*, v.4, n.2, p.180-192, 2015.
- ANTUNES, T.A.; NOBRE, M.O.; FARIA, R.O.; MEINERZ, A.R.M.; MARTINS, A.A.; CLEFF, M.B.; FERNANDES, C.G.; MEIRELLES, M.C.A. Esporotricose cutânea experimental: avaliação *in vivo* do itraconazol e terbinafina. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 42, n. 6, p. 706-710, 2009.
- ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada - RDC n. 899, de 29 de maio de 2003.
- ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada- RDC nº 17, de 16 de Abril de 2010.
- ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Perguntas & Respostas. Assunto: RDC 53/2015 e Guia 04/2015, 2015.
- ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada- RDC nº 166, de 24 de Julho de 2017.
- ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Farmacopeia Brasileira – Monografias. Brasília, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Volume 2, 2019.
- ARAUJO, A.K.L., LEAL, C.A.S. Esporotricose felina no município de Bezerros, Agreste Pernambucano: Relato de caso. *Pubvet*, v.10, n.11, p.816–820, 2016.
- ARAÚJO, F.; PEDRO, J.; GRANJA, P.P.; SANTOS, H.A.; SARMENTO, H.A.; SARMENTO, B. Functionalized materials for multistage platforms in the oral delivery of biopharmaceuticals. *Prog. Mater. Science*. 89:306–344, 2017.

ASCENZI, P.; FANALI, G.; FASANO, M.; PALLOTINI, V.; TREZZA, V. Clinical relevance of drug binding to plasma proteins. *Journal of Molecular Structure*. 1077, 4–13, 2014.

ATRIBEN. Holliday. Disponível em: [https://holliday-scott.com/ar/producto/antiinflamatorios-analgescicos\\_/atriben](https://holliday-scott.com/ar/producto/antiinflamatorios-analgescicos_/atriben). Acesso em: 26 de dezembro de 2021.

BANERJEE, A.; QI, J.; GOGOI, R.; WONG, J.; MITRAGOTRI, S. Role of nanoparticle size, shape and surface chemistry in oral drug delivery. *J. Control. Release*. 238, 176–185, 2016

BARONE, J.A.; MOSPOVITZ, B.L.; GUARNIERI, J.; HASSEL, A.E.; COLAIZZI, J.L.; BIERMAN, R.H.; JESSEN, L. Food interaction and steady state pharmacokinetics of itraconazole oral solution in healthy volunteers. *Pharmacotherapy*. 18, 295-301, 1998.

BARROS, M.B.L., SCHUBACH, T.M.P., GUTIERREZ-GALHARDO, M.C., SCHUBACH, A.O., MONTEIRO, P.C.F., REIS, R.S., ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M., LAZÉRA, M.S., CUZZI-MAYA, T., BLANCO, T.C.M., MARZOCHI, K.B.F., WANKE, B., VALLE, A.C.F. Sporotrichosis: an emergent zoonosis in Rio de Janeiro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.96, n.6, p.777-779, 2001.

BARROS, M.B.L.; PAES, R.A.; SCHUBACH, A.O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Clinical Microbiology Reviews*. v. 24, n. 4, p. 633-654, 2011.

BARROS, M.B.L.; SCHUBACH, T.P.; COLL, J.O.; GREMIÃO, I.D.; WANKE, B.; SCHUBACH, A. Esporotricose: a evolução e os desafios de uma epidemia. *Revista Panamericana de Salud Pública*. v.27, n.6, p.455–60, 2010.

BERGER, S.; EL CHAZLI, Y.; BABU, A.F.; COSTE, A.T. Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*: A Consequence of Antifungal Use in Agriculture? *Front Microbiol*. 7;8:1024, 2017.

BIAN, X.; LIANG, S.; JOHN, J.; HSIAO, C.H.; WEI, X.; LIANG, D.; XIE, H. Development of PLGA - based itraconazole injectable nanospheres for sustained release. *International Journal of Nanomedicine*. 8, 4521–4531, 2013.

BRAZEAU, G.A.; PERSKY, A.; NAPAPOM, J. Dosage Forms: Parenterals. In: Swarbrick James (Ed.). *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. 3rd ed. Informa Healthcare USA, Inc: New York. 1: 1001-11, 2007.

BUCHANAN et al. Pharmacokinetics of itraconazole after intravenous and oral dosing of itraconazole-cyclodextrin formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. v.96, p. 3100–3116, 2007.

BUDAVARI, S. (Ed.), *The Merck Index*, 12th edn., Merck and Co., Inc. Rahway, NJ, p. 916, 1996.

BUIED, A.; MOORE, C.B.; DENNING, D.W.; BOWYER, P. High-level expression of cyp51B in azole-resistant clinical *Aspergillus fumigatus* isolates. *J Antimicrob Chemother*. 68, 512-514, 2013.

BUNTING, E.M.; ABOU-MADI, N.; COX, S.; MARTIN-JIMENEZ, T.; FOX, H.; KOLLIAS, G.V. Evaluation of oral itraconazole administration in captive Humboldt penguins (*Spheniscus humboldti*). *J. Zoo. Wildl. Med.* 40, 508–518, 2009.

CABAÑES, F. J.; Sporotrichosis in Brazil: Animals + humans = one health. *Revista Iberoamericana de Micología.* p. 1-2, 2020.

CARNEIRO, S.B.; COSTA DUARTE, F.I.; HEIMFARTH, L.; SIQUEIRA QUINTANS, J.S.; QUINTANS-JUNIOR, L.J.; VEIGA JUNIOR, V.; NEVES DE LIMA, A.A. Cyclodextrin-Drug Inclusion Complexes: *In Vivo* and *In Vitro* Approaches. *International journal of molecular sciences.* 20(3), 642, 2019.

CDTN, 2020. Laboratório de Irradiação Gama. Disponível em: <https://antigo.cdtm.br/instalacoes-de-grande-porte/laboratorio-de-irradiacao-gama>. Acesso em: 16 de novembro de 2022.

CEVHER, E.; SINANI, G.; AKSU, B.; ZLOH, M. Bioadhesive tablets containing cyclodextrin complex of itraconazole for the treatment of vaginal candidiasis. *International Journal of Biological Macromolecules.* 69, 124–136, 2014.

CHANDLER, F. W.; KAPLAN, W.; AJELLO, L.; A Colour Atlas and Textbook of Histopathology of Mycotic Diseases. *Wolfe Medical Publications Ltd*, pp. 112-115, 1980.

CHAUDHARY, K.K.; KANNOJIA, P.; MISHRA, N. Liquid Crystal Systems in Drug Delivery. *Indian J Pharm Sci.* 81(1):11-21, 2019.

CHENG, Y.S. Mechanisms of Pharmaceutical Aerosol Deposition in the Respiratory Tract. *AAPS PharmSciTech*, 2014.

Chien YW. Parenteral drug delivery and delivery systems. In: *Novel drug delivery system*, 2nd ed. 50. Marcel Dekker: New York 1992; 382-5.

CHIOU, W.L.; RIEGELMAN, S. Oral absorption of griseofulvin in dogs: increased absorption via solid dispersion in polyethylene glycol 6000. *J Pharm Sci.* 59(7):937-942, 1970.

CHOI, H.J.; EBERBACHER, C.F.; KIM, M.C.; KANG, S.M.; MONTEMAGNO, C.D. A mechanistic study on the destabilization of whole inactivated influenza virus vaccine in gastric environment. *PLoS ONE.* 8, 1–14, 2013.

CHOI, Y.K.; POUDEL, B.K.; MARASINI, N.; YANG, K.Y.; KIM, J.W.; KIM, J.O.; CHOI, H.G.; YONG, C.S. Enhanced solubility and oral bioavailability of itraconazole by combining membrane emulsification and spray drying technique. *Int J Pharm.* 434 (1-2): 264-71, 2012.

CHONO, S.; TANINO, T.; SEKI, T.; MORIMOTO, K. Influence of particle size on drug delivery to rat alveolar macrophages following pulmonary administration of ciprofloxacin incorporated into liposomes. *J Drug Target.* (8):557-66, 2006.

CHUDASAMA, A.; PATEL, V.; NIVSARKAR, M.; VASU, K.; SHISHOO, C. Investigation of microemulsion system for transdermal delivery of itraconazole. *J Adv Pharm Technol Res.* 2(1):30-8, 2011.

CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Ninth Edition. CLSI Document M07-A9. Clinical & Laboratory Standards Institute: *CLSI Guidelines.* 2012.

COLES, F.B.; SCHUCHAT, A.; HIBBS, J.R.; KONDRACK, S.F.; SALKIN, I.F.; DIXON, D.M.; CHANG, H.G.; DUNCAN, R.A.; HURD, N.J.; MORSE, D.L. A multistate outbreak of sporotrichosis associated with sphagnum moss. *American Journal of Epidemiology.* v. 136, p. 475-487, 1992.

COLODEL, M.M., JARK, P.C., RAMOS, C.J.R., MARTINS, V.M.V., SCHNEIDER, A.F., PILATI, C. Esporotricose cutânea felina no Estado de Santa Catarina: relato de casos. *Veterinária em Foco,* v.7, p. 18–21, 2009.

CONCEIÇÃO, J.; ADEOYE, O.; CABRAL-MARQUES, H.M; LOBO, J.M.S. Cyclodextrins as drug carriers in pharmaceutical technology: The state of the art. *Curr. Pharm. Des.* 24:1–29, 2018.

CONCEIÇÃO, J.; ADEOYE, O.; CABRAL-MARQUES, H.M; LOBO, J.M.S. Cyclodextrins as excipients in tablet formulations. *Drug Discov. Today.* 23:1274–1284, 2018.

CUENCA-ESTRELLA, M.; GOMEZ-LOPEZ, A.; MELLADO, E.; BUITRAGO, M.J.; MONZÓN, A.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L. *Scopulariopsis brevicaulis*, a Fungal Pathogen Resistant to Broad-Spectrum Antifungal Agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 47, 2339–2341, 2003.

DA ROSA, A.C.M., SCROFERNEKER, M.L., VETTORATO, R., GERVINI, R.L., VETTORATO, G., WEBER, A. Epidemiology of sporotrichosis: A study of 304 cases in Brazil. *Journal of the American Academy of Dermatology.* v.52, n.3, p.451–459, 2005.

DA SILVA, R.C.; DA SILVA, R.M.; AQUINO, K.A.S. A Interação da Radiação Gama com a Matéria no Processo de Esterilização. *Rev. Virtual Quim.* 6 (6), 1624-1641, 2014.

DAI, D.; YANG, H.; NABHAN, S.; LIU, H.; HICKMAN, D.; LIU, G.; ZACHER, J.; VUTIKULLIRD, A.; PRAKASH, C.; AGRESTA, S.; BOWDEN, C.; FAN, B. Effect of itraconazole, food, and ethnic origin on the pharmacokinetics of ivosidenib in healthy subjects. *European Journal of Clinical Pharmacology.* 75:1099–1108, 2019.

DAVIS, E.M.; BREWSTER, E.M. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: Past, present and future. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1023–1035, 2004.

DAVIS, J.L.; SALMON, J.H.; PAPICH, M.G. Pharmacokinetics and tissue distribution of itraconazole after oral and intravenous administration to horses. *Am. J. Vet. Res.* 66, 1694-1701, 2005.

DE BEER, Z.W.; DUONG, T.A.; WINGFIELD, MJ. The divorce of Sporothrix and Ophiostoma: solution to a problematic relationship. *Stud Mycol.* 83:165-91, 2016.



DEL BIANCO, E.; GEPPETTI, P.; ZIPPI, D.; ISOLANI, B.; MAGINI, P.; CAPPUGI, P. The effects of repeated dermal application of capsaicin to the human skin on pain and vasodilatation induced by intradermal injection of acid and hypertonic solutions. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 41, pp. 1-6., 1996.

DESTREE, C.; DEBUIGNE, F.; GEORGE, S.; CHAMPAGNE, B.; GUILLAUME, M.; GHIJSEN, J.; NAGY, J.B. complexes of retinol formed within the nanoparticles prepared from microemulsions. *Colloid. Polym. Sci.* 286, 1463–1470, 2008.

DONCKER, P.D.; GUPTA, A.K.; MARYNISSEN, G.; STOFFELS, P.; HEREMANS, A. Itraconazole pulse therapy for onychomycosis and dermatomycoses: *An overview. J Am Acad Dermatol.* 37:969-974, 1997.

DONG, X. Current Strategies for Brain Drug Delivery. *Theranostics.* Vol. 8, Issue 6, 2018.

DURET, C.; MERLOS, R.; WAUTHOZ, N.; SEBTI, T.; VANDERBIST, F.; AMIGHI, K. Pharmacokinetic evaluation in mice of amorphous itraconazole-based dry powder formulations for inhalation with high bioavailability and extended lung retention. *Eur J Pharm Biopharm.* 86 (1):46-54, 2014.

DURET, C.; WAUTHOZ, N.; SEBTI, T.; VANDERBIST, F.; AMIGHI, K. Solid dispersions of itraconazole for inhalation with enhanced dissolution, solubility and dispersion properties. *International Journal of Pharmaceutics.* 428, 103– 113, 2012.

EL-BARGHOUTI, M.I.; MASOUD, N.A.; AL-KAFAWEIN, J.K. et al. Inclusion complexation of Itraconazole with  $\beta$ - and 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrins in aqueous solutions. *Russ. J. Phys. Chem.* 80, 1050–1055, 2006.

ELWORTHY, P.H.; FLORENCE, A.T. Chemistry of non-ionic detergents part X: activity coefficients of polyoxyethylene glycols and alkyl polyoxyethylene glycol ethers in aqueous solution. *Kolloid Z.* 208:157–62, 1966.

EMAMI, S.; TAVANGAR, P.; KEIGHOBADI, M. An overview of azoles targeting sterol 14 $\alpha$ -demethylase for antileishmanial therapy. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 135, 241-259, 2017.

ESPINEL-INGROFF, A.; ABREU, D.P.B.; ALMEIDA-PAES, R.; BRILHANTE, R.S.N.; CHAKRABARTI, A.; CHOWDHARY, A.; HAGEN, F.; CÓRDOBA, S.; GONZALEZ, G.M.; GOVENDER, N.P.; GUARRO, J.; JOHNSON, E.M.; KIDD, S.E.; PEREIRA, S.A.; RODRIGUES, A.M.; ROZENTAL, S.; SZESZS, M.W.; BALLESTÉ, A.R.; BONIFAZ, A.; BONFIETTI, L.X.; BORBA-SANTOS, L.P.; CAPILLA, J.; COLOMBO, A.L.; DOLANDE, M.; ISLA, M.G.; MELHEM, M.S.C.; MESA-ARANGO, A.C.; OLIVEIRA, M.M.E.; PANIZO, M.M.; PIRES DE CAMARGO, Z.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M.; MEIS, J.F.; TURNIDGE, J. Multicenter, International Study of MIC/MEC Distributions for Definition of Epidemiological Cutoff Values for *Sporothrix* Species Identified by Molecular Methods. *Antimicrob Agents Chemother.* 22;61(10):e01057-17, 2017.

FAHR, A.; LIU, X. Drug delivery strategies for poorly water-soluble drugs. *Expert Opin Drug Deliv.* 4(4): 403–416, 2007.

FERREIRA, C.P. Descrição de aspectos clínicos e laboratoriais de pacientes com esporotricose e leishmaniose tegumentar americana, com ênfase em mulheres grávidas. p. 112. Tese de Dissertação, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2016.

FERREIRA NETO, J.M; VIANA, E.S; MAGALHAES, L.M. Patologia clínica veterinária. Belo Horizonte, Rabelo, 1981.

FIOCRUZ, 2015. Esporotricose: pesquisadores esclarecem sobre a doença, que pode afetar animais e humanos. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/noticia/esporotricose-pesquisadores-esclarecem-sobre-doenca-que-pode-afetar-animais-e-humanos>. Acesso em 06 de novembro de 2022.

FOTAKI, N.; KLEIN, S. Mechanistic Understanding of the Effect of PPIs and Acidic Carbonated Beverages on the Oral Absorption of Itraconazole Based on Absorption Modeling with Appropriate *in Vitro* Data. *Mol Pharm.* 10, 4016 – 4023, 2013.

FRANCOIS, M.; SNOECKX, E.; PUTTEMAN, P.; WOUTERS, F.; DE PROOST, E.; DELAET, U.; PEETERS, J.; BREWSTER, M.E. A mucoadhesive, cyclodextrin-based vaginal cream formulation of itraconazole. *AAPS PharmSci.* 5(1):E5, 2003.

GARAD, S., et al., Preclinical Development for Suspensions, in *Pharmaceutical Suspensions - From Formulation Development to Manufacturing*, A.K. Kulshreshtha, O.N. Singh, and G.M. Wall, Editors. p. 127-176, 2010.

GASCO, M.R. Microemulsions in the pharmaceutical field: perspectives and applications. In: Solans C, Kunieda H. *Industrial applications of microemulsions. New York: Marcel Dekker.* v.66. cap.5. p.97-122, 1997.

GAVIRIA-RIVERA, A.; GIRALDO-LÓPEZ, A.; CANO-RESTREPO, L.E. *In vitro* antifungal susceptibility of clinical isolates of *Fusarium* from Colombia. *Rev. Salud Pública.* 19, 800-805, 2017.

GENNARO, A.R. (Ed.) *Rheology in Remington: the science and practice of pharmacy*, SCHOTT, H.; ed. Philadelphia. 2077 p., 2000.

GIRMENIA, C. New generation azole antifungals in clinical investigation. *Expert Opinion on Investigational Drugs.* 18, 1279–1295, 2009.

GLASMACHERM, A.; MOLITOR, E.; MEZGER, J.; MARKLEIN, G. Antifungal prophylaxis with itraconazole in neutropenic patients: pharmacological, microbiological and clinical aspects. *Mycoses.* 39:249-258, 1996.

GONOTEC, 2009. User Guide: Cryoscopic Osmometer OSMOMAT® auto: Disponível Em: <[https://www.wolflabs.co.uk/document/Gonotec\\_Osmometer\\_Auto\\_manual.pdf](https://www.wolflabs.co.uk/document/Gonotec_Osmometer_Auto_manual.pdf)>. Acesso em 16 de novembro de 2022.

GOULD, D. Feline Herpesvirus-1. Ocular manifestations, diagnosis and treatment options. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, Reino Unido, v. 13, n. 5, p. 333- 346, 2011.

GREGÓRIO, C. Review: A History of Cyclodextrins. *Chem. Rev.* 114:10940–10975, 2014.

GREMIÃO, I.; SCHUBACH, T.; PEREIRA, S.; RODRIGUES, A.; HONSE, C.; BARROS, M. Treatment of refractory feline sporotrichosis with a combination of intralesional amphotericin B and oral itraconazole. *Aust Vet J.* 89(9):346-51, 2011.

GREMIÃO, I.D.; SCHUBACH, T.M.; PEREIRA, S.A.; RODRIGUES, A.M.; CHAVES, A.R.; BARROS, M.B. Intralesional amphotericin B in a cat with refractory localised sporotrichosis. *J Feline Med Surg.* 11(8):720-3, 2009.

GREMIÃO, I.D.F., MIRANDA, L.H.M., REIS, E.G., RODRIGUES, A.M., PEREIRA, S.A. Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: Cat to Human Transmission. *PLOS Pathogens.* v.13, n.1, p.2–8, 2017.

GREMIÃO, I.D.F., SCHUBACH, T.M.P., PEREIRA, S.A., RODRIGUES, A.M., CHAVES, A.R., BARROS, M.B.L. Case report: intralesional amphotericin b in a cat with refractory localised sporotrichosis. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v.11, n.8, p.720-723, 2009.

GREMIÃO, I.D.F.; OLIVEIRA, M. M. E.; MIRANDA, L. H. M.; FREITAS, D. F. S.; PEREIRA, S. A. Geographic Expansion of Sporotrichosis, Brazil. *Emerging Infectious Diseases.* v. 26, n. 3, 2020.

GREMIÃO, I.D.F.; PEREIRA, S.A.; RODRIGUES, A.M.; FIGUEIREDO, F.B.; NASCIMENTO-JÚNIOR, A.; SANTOS, I.B.; SCHUBACH, T.M.P. Tratamento cirúrgico associado à terapia antifúngica convencional na esporotricose felina. *Acta Scientiae Veterinariae.* v. 34, n. 2, p. 221-223, 2006.

GRONEBERG, D.A.; NICKOLAUS, M.; SPINGER, J.; DORING, F.; DANIEL, H.; FISCHER, A. Localization of peptide transporter PEPT2 in the lung: implications of pulmonary oligopeptide uptake. *Am J Pathol.* 158:707–14, 2001.

GRONENBERG, D.A.; WITT, C.; WAGNER, U.; CHING, K.F.; FISCHER, A. Fundamentals of pulmonary drug delivery. *A Respir Med.* 97(4):382-7, 2003.

GROVES, M.J. Parenteral drug delivery system. In: Mathiowitz Edith (Ed.). *Encyclopedia of Controlled Release.* John Wiley & Sons, Inc: New York. 1-2: 743-77, 1952.

GUTIERREZ-GALHARDO, M.C., FREITAS, D.F.S., DO VALLE, A.C.F., ALMEIDA-PAES, R., DE OLIVEIRA, M.M.E., ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M. Epidemiological Aspects of Sporotrichosis Epidemic in Brazil. *Current Fungal Infection Reports*, v.9, n.4, p.238–245, 2015.

HANCOCK, B.C.; PARKS, M. What is the true solubility advantage for amorphous pharmaceuticals? *Pharm Res.* 17(4):397-404, 2000.

HARDIN, T.C.; GRAYBILL, J.R.; FETCHICK, R.; WOESTENBORGH, R.; RINALDI, M.G.; KUHN, J.G. Pharmacokinetics of itraconazole following oral administration to normal volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32, 1310-1313, 1988.

HARTMANN, K.; DAY, M.J.; THIRY, E.; LLORET, A.; FRYMUS, T.; ADDIE, D.; BOUCRAUT-BARALON, C.; EGBERINK, H.; GRUFFYDD-JONES, T.; HORZINEK, M.C.; HOSIE, M.J.; LUTZ, H.; MARSILIO, F.; PENNISI, M.G.; RADFORD, A.D.; TRUYEN, U.; MOSTL, K. European Advisory Board on Cat Diseases. Feline injection-site sarcoma: ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg.* 17(7):606-13, 2015.

HEKTON, L.; PERKINS, C. F. Refractory subcutaneous abscess caused by *Sporothrix schenckii*: a new pathogenic fungus. *Journal of Experimental Medicine.* v. 5, p. 77-91, 1900.

HONG, J.Y.; KIM, J.K.; SONG, Y.K.; PARK, J.S.; KIM, C.K. A new self-emulsifying formulation of itraconazole with improved dissolution and oral absorption. *J Control Release.* 110(2):332-338, 2006.

HU, Q.; LUO, Y. Recent advances of polysaccharide-based nanoparticles for oral insulin delivery. *Int. J. Biol. Macromol.* 120:775–782, 2018.

HUANG, J. Formulation Forum – Considerations in Formulation Development of Injectable Solutions. Disponível em: <https://drug-dev.com/formulation-forum-considerations-in-formulation-development-of-injectable-solutions/>. Acesso em: 14 de janeiro de 2021.

HUNT, A.; HARRINGTON, D.; ROBINSON, S. Vitamin B12 deficiency. *BMJ.* 4;349:g5226, 2014.

INGBER, A. Intermittent low dose itraconazole treatment for onychomycosis--long term follow-up. *Med Mycol.* 39(6):471-3, 2001.

JAFARINEJAD, S.; GILANI, K.; MOAZENI, E.; GHAZI-KHANSARI, M.; NAIJAFABADI, A.R.; MOHAJEL, N. Development of chitosan-based nanoparticles for pulmonary delivery of itraconazole as dry powder formulation. *Powder Technology.* 222, 65–70, 2012.

JAGDALE, S.K.; NAWALE, R.B. Solubilization and determination of solution thermodynamic properties of itraconazole in different solvents at different temperatures. *Drug Dev Ind Pharm.* 45(7):1168-1180, 2019.

JAIWAL, M.; KUMAR, M.; PATHAK, K. Zero order delivery of itraconazole via polymeric micelles incorporated in situ ocular gel for the management of fungal keratitis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 130, 23–30, 2015.

JARURATANASIRIKUL, S.; KLEPKAEW, A. Influence of an acidic beverage (Coca-Cola) on the absorption of itraconazole. *Eur J Clin Pharmacol.* 52:235–237, 1997.

JARURATANASIRIKUL, S.; SRIWIRIJAJAN, S. Effect of rifampicin on the pharmacokinetics of itraconazole in normal volunteers and AIDS patients. *Eur J Clin Pharmacol.* 54(2):155-158, 1998.

JOG, R.; BURGESS, D.J. Pharmaceutical Amorphous Nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 39-65, 2017.

JOHRI, A.; YADAV, S.; SINGH, R.L.; DHAWAN, A.; ALI, M.; PARMAR, D. Long lasting effects of prenatal exposure to deltamethrin on cerebral and hepatic cytochrome P450s and behavioral activity in rat offspring. *Eur J Pharmacol.* 544(1-3):58-68, 2006.

JONES, L. M. Farmacologia e terapêutica veterinária. 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1983. Pag. 35.

JONES, M.C.; LEROUX, J.C. Polymeric micelles—a new generation of colloidal drug carriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 48, no. 2, pp. 101–111, 1999.

JULIAN, E.; MARTIN, J.; HOLLAMBY, H. Recent advances in nanoparticle synthesis with reversed micelles. *Adv. Colloid. Interf. Sci.* 128, 5–15, 2006.

KALTANBACH, G.; LEVEGE, D.; PETER, J.D.; SALMON, J.; ELKHAILI, H.; CAVALIER, A.; SALMON, Y.; MONTEIL, H.; JEHL, F.H. Pharmacokinetic interaction between itraconazole and rifampin in Yucatan miniature pigs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:2043-2046, 1996.

KALYANI, M.; SURENDRA, P.; SIRICHA, V. Parenteral controlled drug delivery system. *Int J Res Pharm Nano Sci.* 2:572-80, 2013.

KARASHIMA, M.; SANO, N.; YAMAMOTO, S.; ARAI, Y.; YAMAMOTO, K.; AMANO, N. Enhanced pulmonary absorption of poorly soluble itraconazole by micronized cocrystal dry powder formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 115, 65–72, 2017.

KAUFFMAN, C.A. Sporotrichosis. *Clinical Infectious Diseases.* v. 29, n. 2, p. 231-236, 1999.

KAUSHIK, N.; PUIALTE, G.G.; REESE, S.T. Superficial Fungal Infections. *Prim Care.* 42(4):501-16, 2015.

KELLER, K.A. Itraconazole. *Journal of Exotic Pet Medicine.* 20, 156–160, 2011.

KIM, S.H.; PARK, J.H.; KIM, Y.I.; KIM, C.W.; HAN, M.C. Experimental tissue damage after subcutaneous injection of water-soluble contrast media. *Invest. Radiol.*, 25, pp. 678-685, 1990.

KIRSI-MAIJA, J.; JUHANI, P.; PERTTI, N. Itraconazole Decreases Renal Clearance of Digoxin. *Ther Drug Monit.* 19:609-613, 1997.

KUMAR, N. & GOINDI, S. Statistically designed nonionic surfactant vesicles for dermal delivery of itraconazole: characterization and *in vivo* evaluation using a standardized Tinea pedis infection model. *The International Journal of Pharmaceutics.* v.472, n.1-2, p. 224-240, 2014.

KUNZE, K.L.; NELSON, W.L.; KHARASCH, E.D.; THUMMEL, K.E.; ISOHERRANEN, N. Stereochemical aspects of itraconazole metabolism *in vitro* and *in vivo*. *Drug Metab. Dispos.* 34, 583-590, 2006.

KWON-CHUNG, K.J.; BENNETT, J. E. Sporotrichosis In: Medical Mycology. Philadelphia: Lea & Febiger. p. 707-729, 1992.

Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias (LACVET), 2022. Indicadores de proteínas plasmáticas. Disponível em: <<https://www.ufrgs.br/lacvet/componentes-do-perfil-bioquimico/tproteinas-totais/>>. Acesso em: 06 de novembro de 2022.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCAR, E.M.; TAKAHASHI, N.; Tratado de Micologia Médica. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. v. 44, n. 04, 2002.

LANGE, D.; PVAO, J.H.; JACQMIN, P.; WOESTENBORGS, R.; DING, C.; KLAUSNER, M. The effect of coadministration of a cola beverage on the bioavailability of itraconazole in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Curr Ther Res Clin Exp*, 58, 202 – 212, 1997.

LARSSON, C.E. Esporotricose. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. v.48, n.3, p.250-259, 2011.

LARSSON, C.E.; GONÇALVES, M.A.; ARAUJO, V.C.; DAGLI, M.L.Z.; CORREA, B.; FAVA NETO, C. Esporotricose felina: aspectos clínicos e zoonóticos. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. v. 31, n. 5, p. 351-358, 1989.

LEI, J.; YOU, H.J. Variation of pain and vasomotor responses evoked by intramuscular infusion of hypertonic saline in human subjects: influence of gender and its potential neural mechanisms *Brain Res. Bull.* 87, pp. 564-570, 2012.

LEMKE, T.L.; WILLIAMS, D.A. Foye's Principles of Medicinal Chemistry. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, 5<sup>a</sup> ed., p. 1114, 2002.

LESTNER, J.; HOPE, W.W. Itraconazole: an update on pharmacology and clinical use for treatment of invasive and allergic fungal infections. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 9, 911-926, 2013.

LEUNER, C.; DRESSMAN, J. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. *Eur J Pharm Biopharm.* 50(1):47-60, 2000.

LIM, W.M.; RAJINIKANTH, P.S.; MALLIKARJUN, C.; KANG, Y.B. Formulation and delivery of itraconazole to the brain using a nanolipid carrier system. *Int J Nanomedicine.* 2;9:2117-26, 2014.

LIU, L.; BELLO, A.; DRESSER, M.J.; HEALD, D.; KOMIATHY, S.F.; O'MARA, E.; ROGGE, M.; STOCH, S.A.; ROBERTSON, S.M. Best practices for the use of itraconazole as a replacement for ketoconazole in drug-drug interaction studies. *J Clin Pharmacol.* 56:143-151, 2016.

LLORET, A.; HARTMANN, K.; PENISSI, M.G.; FERRER, L.; ADDIE, D.; BELÁK, S.; BOUCRAUT-BARALON, C.; EGBERINK, H.; FRYMUS, T.; GRUFFYDD-JONES, T.; HOSSIE, M.J.; LUTZ, H.;

MARSILIO, F.; MOSTL, K.; RADFORD, A.D.; THIRY, E.; TRUYEN, U.; HORZINEK, M.C. Sporotrichosis in cats abcd guidelines on prevention and management. *J. Feline Med. Surg.* 15, 619-623, 2013.

LOPES-BEZERRA, L. M., MORA-MONTES, H. M., ZHANG, Y., NINO-VEGA, G., RODRIGUES, A. M., DE CAMARGO, Z. P., DE HOOG, S. Sporotrichosis between 1898 and 2017: The evolution of knowledge on a changeable disease and on emerging etiological agents. *Medical Mycology.* v.56, p. 126–143, 2018.

LUKULAY, P; HOKANSON, G. Reconciling Mass Balance in Forced Degradation Studies. *Pharmaceutical Technology*, Volume 29, Issue 10, 2005.

LUTZ, A.; SPLENDORE, A. Sobre uma micose observada em homens e ratos. *Revista de Medicina.* v. 21, p. 433–50, 1907.

MACHKOVECH, S.; FOSTER, T. Aqueous Suspensions, in Long-Acting Injections and Implants, J.C. Wright and D.J. Burgess, Editors. *Springer US.* p. 137-151, 2012.

MADRID, I. M.; MATTEI, A. S.; FERNANDES, C. G.; NOBRE, M. O.; MEIRELES, M. C. A. Epidemiological findings and laboratory evaluation of Sporotrichosis: a description of 103 cases in cats and dogs in southern Brazil. *Mycopathologia.* v. 173, p. 265–73, 2012.

MADRID, I.M., JÚNIOR, R.S., JÚNIOR, D.P.S., MUELLER, E.N., DUTRA, D., NOBRE, M.O., MEIRELES, M.C.A. Esporotricose canina: relato de três casos. *Acta Scientiae Veterinariae.* v.35, n.1, p.105-108, 2007.

MADRID, I.M.; MATTEI, A.; MARTINS, A.; NOBRE, M.; MEIRELES, M. Feline Sporotrichosis in the Southern Region of Rio Grande Do Sul, Brazil: Clinical, Zoonotic and Therapeutic Aspects. *Zoonoses and Public Health.* 57, 151–154, 2010.

MARIMON, R., GENÉ, J., CANO, J., TRILLES, L., DOS SANTOS, L.M., GUARRO J. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. *Journal of Clinical Microbiology.* v.44, n.9, p.3251-3256, 2006.

MARQUES-MELO, E.H., LESSA, D.F.S., NUNES, A.C.B.T., CHAVES, K.P., PORTO, W.J.N., NOTOMI, M.K., GARRIDO, L.H.A. Felino doméstico como agente transmissor de esporotricose para humano: relato do primeiro caso no estado de Alagoas. *Revista Baiana Saúde Pública,* v.38, n.2, p.490–498, 2014.

MARTIN, A.; WARBRICK, J.; CAMMARATA, A. Rheology in Physical Pharmacy; 4<sup>th</sup>. Ed. Philadelphia: Lea & Febiger. 622 p, 1993.

MARTIN, M.V. The use of fluconazole and itraconazole in the treatment of *Candida albicans* infections: a review. *J. Antimicrob. Chemother.* 44, 429-437, 1999.

MASTROENI, M.F. Biossegurança aplicada a laboratórios e serviços de saúde. Ed. Atheneu. São Paulo, p.160-161, 2004.

MCCLEMENT, D.J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter*, edição 6, 2012.

MERISKO-LIVERSIDGE, E.; LIVERSIDGE, G.G.; COOPER, E.R. Nanosizing: a formulation approach for poorly-water-soluble compounds. *Eur J Pharm Sci.* 18(2): 113-120, 2003.

MERISKO-LIVERSIDGE, E.M.; LIVERSIDGE, G.G. Drug nanoparticles: formulating poorly water-soluble compounds. *Toxicol Pathol.* 36(1):43-48, 2008.

MEYER, D.J.; HARVEY, J.W. Veterinary laboratory medicine: interpretation & diagnosis 2.ed. Philadelphia: Sauders. 351p. 2004.

MIDDLETON, E.; RONDINA, M.T. Platelets in infectious disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* (1):256-261, 2016.

MOHANTY, B.; MISHRA, S.K.; MAJUMDAR, D.K. *In Vitro* Permeation Characteristics of Itraconazole from Oil Drops and Ophthalmic Ointment Through Excised Goat And Sheep Corneas. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences.* Volume 5, Issue 3, PP 19-26, 2013.

MORTENSEN, K.L.; MELLADO, E.; LASS-FLORL, C.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; JOHANSEN, H.K., et al. Environmental study of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* and other aspergilli in Austria, Denmark, and Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 4545–4549, 2010.

MULLER, R.H.; MADER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm.* 50(1):161-77, 2000.

NAIR, A.; JABOB, S.; AL-DHUBIAB, B.; ATTIMARAD, M.; HARSHA, S. Basic considerations in the dermatokinetics of topical formulations. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 49, n. 3, 2013.

NESSEEM, D.I. Formulation and evaluation of itraconazole via liquid crystal for topical delivery system. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 387–399, 2001.

NETZ, P. A.; ORTEGA, G. G. Fundamentos da físico-química: Uma abordagem conceitual para as ciências farmacêuticas. Porto Alegre: Artmed. 299p., 2002.

NIEDERMIRTL, F.; EBERHARDT, M.; NAMER, B.; LEFFLER, A.; NAU, C.; REEHM P.W.; KISTNER, K. Etomidate and propylene glycol activate nociceptive TRP ion channels. *Mol Pain.* 14:1744806918811699, 2018.

NOBRE, M.O.; NASCENTE, P.S.; MEIRELES, M.C.; FERREIRO, L. Antifungal drugs for small and large animals. *Ciência Rural*, 2002.

OLIVEIRA, M.M.E. Identificação e análise filogenética de espécies do gênero *Sporothrix* isoladas em área endêmica de esporotricose no Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2009.



O'REILLY, L.C.; ALTMAN, S.A. Macrorestriction analysis of clinical and environmental isolates of *Sporothrix schenckii*. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 44: p. 2547-2552, 2006.

PAL, P. *et al.* Design and development of a safer non-invasive transungual drug delivery system for topical treatment of onychomycosis. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v.41, n.7, 1095–1099, 2015.

PARIKH, S.K.; DAVE, J.B.; PATEL, C.N.; RAMALINGAN, B. Stability-indicating high-performance thin-layer chromatographic method for analysis of itraconazole in bulk drug and in pharmaceutical dosage form. *Pharm Methods*. (2):88-94, 2011.

PASSOS, J. S.; MARTINO, L. C.; DARTORA, V. F. C.; ARAUJO, G. L. B.; ISHIDA, K.; LOPES, L. B. Development, Skin Targeting And Antifungal Efficacy Of Topical Lipid Nanoparticles Containing Itraconazole, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2020.

PATIL, J.S.; SARASJIA, S. Pulmonary drug delivery strategies: A concise, systematic review. *Lung India*. 29(1):44-9, 2012.

PEETERS, J.; NEESKENS, P.; TOLLENAERE, J.P.; VAN REMOORTERE, P.; BREWSTER, M.E. Characterization of the interaction of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin with itraconazole at pH 2, 4, and 7. *J Pharm Sci*. 91(6):1414-22, 2002.

PELCZAR JR, M. J.; CHAN, E.C.; KRIEG, N. R. Microbiologia: conceitos e aplicações. Makron Books. São Paulo. V. 1, ed. 2, p. 64-65; 194-195, 1996.

PEREIRA, S.A.; GREMIÃO, I.D.F.; KITADA, A.A.B.; BOECHAT, J.S.; VIANA, P.G.; SCHUBACH, T.M.P. The epidemiological scenario of feline sporotrichosis in Rio de Janeiro, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 47, n. 3, p. 392-393, 2014.

PEREIRA, S.A.; PASSOS, S.R.; SILVA, J.N.; GREMIÃO, I.D.; FIGUEIREDO, F.B.; TEIXEIRA, J.L.; MONTEIRO, P.C.; SCHUBACH, T.M. Response to azolic antifungal agents for treating feline sporotrichosis. *Veterinary Record*. v. 166, p. 290–294, 2010.

PEREIRA, S.A.; SCHUBACH, T.M.; GREMIÃO, I.D.; SILVA, D.T.; FIGUEIREDO, F.B.; ASSIS, N.V.; PASSOS, S.R.L. Aspectos terapêuticos da esporotricose felina. *Acta Scientiae Veterinariae*. v. 37. n. 4, p. 331-341, 2009.

PEYTON, L.R.; GALLAGHER, S.; HASHEMZADEH, M. Triazole antifungals: a review. *Drugs of Today*. v. 51, n. 12, p. 705-718, 2015.

PLUMB, D.V. Itraconazole, in Plumb DV (ed): *Veterinary Drug Handbook* (ed 5), Ames, IA, *Blackwell Publishing*, pp 431-433, 2005.

PRASAD, R.; SHAH, A. H.; RAWAL, M. K. Antifungals: Mechanism of Action and Drug Resistance. In: RAMOS, J.; SYCHROVÁ, H.; KSCHISCHO, M. (Ed.). *Yeast Membrane Transport*. Cham: Springer International Publishing, p. 327– 349, 2016. PREFEITURA DE BELO HORIZONTE.

Esporotricose: Protocolo de enfrentamento da doença em Belo Horizonte, 2018. Disponível em: <[https://prefeitura.pbh.gov.br/sites/default/files/estrutura-de-governo/saude/Protocolo\\_esporotricose-12-2-2019.pdf](https://prefeitura.pbh.gov.br/sites/default/files/estrutura-de-governo/saude/Protocolo_esporotricose-12-2-2019.pdf)>. Acesso em 21 de março de 2020.

PRENTICE, A.G.; GLASMACHER, A. Glasmacher, A. Making sense of itraconazole pharmacokinetics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 56, Suppl. S1, i17-i22, 2005.

QUEIROS-TELLES, F., BUCCHERI, R., & BENARD, G. Sporotrichosis In Immunocompromised Hosts. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, v. 5, n.1, 2019.

QUINTAL, D. Sporotrichosis infection on mines of the Witwatersrand. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*. v. 4, p. 51-54, 2000.

RAMOS E SILVA, M.; VASCONCELOS, C.; CARNEIRO, S.; CESTARI, T. Sporotrichosis. *Clinics in Dermatology*. v. 25, n. 2, p. 181-187, 2007.

REIS, E.G.; GREMIÃO, I.D.; KITADA, A.A.; ROCHA, R.F.; CASTRO, V.S.; BARROS, M.B.; MENEZES, R.C.; PEREIRA, S.A.; SCHUBACH, T.M. Potassium iodide capsule treatment of feline sporotrichosis. *J Feline Med Surg*. (6):399-404, 2012.

RHEE, Y.S.; PARK, C.W.; NAM, T.Y.; CHI, S.C.; PARK, E.S. Formulation of Parenteral Microemulsion Containing Itraconazole. *Arch Pharm Res*. Vol 30, No 1, 114-123, 2007.

RIESS, G. Micellization of block copolymers. *Progress in Polymer Science*, vol. 28, no. 7, pp. 1107–1170, 2003.

RIEUX, A.; FIEVEZ, V.; GARINOT, M.; SCHNEIDER Y.J.; PREAT, V. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach. *Journal of Controlled Release*, vol. 116, no. 1, pp. 1–27, 2006.

RODRIGUES, A.M.; DE HOOG, G.; ZHANG, Y.; DE CAMARGO, Z.P. Emerging sporotrichosis is driven by clonal and recombinant *Sporothrix* species. *Emerging Microbes and Infections*, v.3, p.1-10, 2014.

RODRIGUES, A.M.; DE HOOG, G.S.; DE CAMARGO, Z.P. *Sporothrix* Species Causing Outbreaks in Animals and Humans Driven by Animal–Animal Transmission. *PLoS Pathog* 12(7). 2016.

RODRIGUES, A.M.; DELLA TERRA, P.P.; GREMIÃO, I.D.; PEREIRA, S.A.; OROFINO-COSTA, R.; DE CAMARGO, Z.P. The threat of emerging and re-emerging pathogenic *Sporothrix* species. *Mycopathologia*. 2020.

RODRIGUES JÚNIOR., A. A.; CALDAS, L. V. E. Commercial plate window glass tested as routine dosimeter at a gamma irradiation facility. *Radiation Physics and Chemistry*, v.63, p.765–767, 2002.

ROSSI, C.N.; ODAQUIRI, J.; LARSSON, C.E. Retrospective Assessment of the Treatment of Sporotrichosis in Cats and Dogs Using Itraconazole. *Acta Sci Vet*. 41, 1112, 2013.

ROWE, R.C.; SHESKEY, P.J.; QUINN, M.E. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 6th Edition, Pharmaceutical Press, 2009.

ROY, C.; CHAKRABARTY, J.; PATEL, H.B. Development and Validation of a Stability Indicating Binary RP UPLC Method for Determination of Itraconazole in Capsules dosage form. *International Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2(3): 165-174, 2012.

SALÚSTIO, P.J.; PONTES, P.; CONDUTO, C.; SANCHES, I.; CARVALHO, C.; ARRAIS, J.; MARQUES, H.M.C. Mini-Review Advanced Technologies for Oral Controlled Release: Cyclodextrins for Oral Controlled Release. *AAPS PharmSciTech*. 12:1276–1292, 2011.

SANDELL, L.S.; GORING, D.A.I. Correlation between the temperature dependence of apparent specific volume and the conformation of oligomeric propylene glycols in aqueous solution. *J Polym Sci Part A-2 Polym Phys*. 9:115–26, 1971.

SANTOS, A.F.; ROCHA, B.D.; VALGAS E BASTOS, C.; OLIVEIRA, C.S.F.; SOARES, D.F.M; PAIS, G.C.T.; XAULIM, G.M.D.; KELLER, K.M.; SALVATO, L.A.; LECCA, L.O.; FERREIRA, L.; SARAIVA, L.H.G.; ANDRADE, M.B.; PAIVA, M.T.; ALVES, M.R.S.; MORAIS, M.H.F.; AZEVEDO, M.I.; TEIXEIRA, M.K.I.; ECCO, R.; BRANDÃO, S.T. Guia Prático para enfrentamento da Esporotricose Felina em Minas Gerais. *Revista V&Z Em Minas*. Ano XXXVIII, n. 137, 2018.

SANTOS, C.; GOMES, P.S.; DUARTE, J.A., et al. Relevance of the sterilization-induced effects on the properties of different hydroxyapatite nanoparticles and assessment of the osteoblastic cell response. *J R Soc Interface*. 9(77):3397-3410, 2012.

SCHENCK, B. R. Refractory subcutaneous abscess caused by a fungus possibly related to the Sporotricha. *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital*. v. 9, p. 286-290, 1898.

SCHUBACH, A. Sporotrichosis. In: GREENE, C.E. Infectious Diseases of the Dog and Cat-E-Book. St. Louis: Elsevier Health Sciences, p. 1376, 2013.

SCHUBACH, A., BARROS, M.B., WANKE, B. Epidemic sporotrichosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*. v.21, n.2, p.129-133, 2008.

SCHUBACH, T.; VALLE, A.; GUTIERREZ-GALHARDO, M.; MONTEIRO, P.; REIS, R.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R.; MARZOCHI, K.B.; SCHUBACH, A. Isolation of *Sporotrix schenckii* from the nails of domestic cats (*Felis catus*). *Medical Mycology*, v. 39, n.1, p. 147-149, 2001.

SCHUBACH, T.M., SCHUBACH, A., OKAMOTO, T., BARROS, M.B., FIGUEIREDO, F.B., CUZZI, T., PEREIRA, S.A., DOS SANTOS, I.B., ALMEIDA-PAES, R.D., PAES LEME, L.R., WANKE, B. Canine sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: clinical presentation, laboratory diagnosis and therapeutic response in 44 cases (1998-2003). *Medical Mycology*. v. 44, n.1, p. 87-92, 2006.

SCHUBACH, T.M.P., SCHUBACH, A., OKAMOTO, T. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998–2001). *American Veterinary Medical Association*. v.224, n.10, p.1623-1629, 2004.

SCHUBACH, T.M.P.; MENEZES, R.C.; WANKE, B. Sporotrichosis. In: GREENE, C.E. (ed.). *Infectious Diseases of the Dog and Cat 4.ed.* St. Louis: Elsevier, 2012, p.645- 650.

SERAJUDDIN, A. Solid dispersion of poorly water-soluble drugs: early promises, subsequent problems, and recent breakthroughs. *J Pharm Sci.* 88(10): 1058-1066, 1999.

SHAH, N.H.; CARVAJA, M.T.; PATEL, C.L.; INFELD, M.H.; MALICK, A.W. Selfemulsifying drug delivery systems (SEDDS) with polyglycolized glycerides for improving *in vitro* dissolution and oral absorption of lipophilic drugs. *Int J Pharm.* 106:15–23, 1994.

SHAPIRO, R. S.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. v. 75, n. 2, p. 213-267, 2011.

SHEN, J.J.; JEMEC, G.B.E.; ARENDRUP, M.C.; SAUNTE, D.M.L. Photodynamic therapy treatment of superficial fungal infections: A systematic review. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 31:101774, 2020.

SIGLER, L.; HARRIS, J.L.; DIXON, D.M.; FLIS, A.L.; SALKN, I.F.; KEMNA, M.; DUNCAN, R.A. Microbiology and potential virulence os *Sporothrix cyanescens*, a fungus rarely isolated from blood and skin. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 28, n. 5, p. 1009-1015, 1990.

SILVA, R.C.; SILVA, R.M.; AQUINO, K.A.S. A Interação da Radiação Gama com a Matéria no Processo de Esterilização. *Revista Virtual de Química*, v. 6 n. 6, 2014.

SILVA, H.M.; HUDSON, S.P.; TAJBER, L., *et al.* Osmolality of Excipients for Parenteral Formulation Measured by Freezing Point Depression and Vapor Pressure – A Comparative Analysis. *Pharm Res*, 2022.

SILVA, P. Absorção das drogas. *Farmacologia*. 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Pag. 29., 1998.

SMITH, J.A.; PAPICH, M.G.; RUSSEL, G.; MITCHELL, M.A. Effects of compounding on pharmacokinetics of itraconazole in black-footed penguins (*Spheniscus demersus*). *J. Zoo Wildl. Med.* 41, 487-495, 2010.

SOUZA, E.W.; BORBA, C.M.; PEREIRA, S.A; GREMIÃO, I.D.F; LANGOHR, I.M.; OLIVEIRA, M.M.E; OLIVEIRA, R.V.C.; CUNHA, C.R.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R.M.; MIRANDA, L.H.M.; MENEZES, R.C. Clinical features, fungal load, coinfections, histological skin changes, and itraconazole treatment response of cats with sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis*. *Sci. Rep.* 8, 9074, 2018.

ST-GERMAIN, G.; SUMMERBELL, R. Identifying filamentous fungi. In: A clinical laboratory handbook. California: Star Publishing Company, 1996.

SUETH-SANTIAGO, V.; FRANKLIM, T.N.; LOPES, N.D.; LIMA, M.E.F. CYP51:Uma boa ideia? *Revista Virtual de Química*. 07, 539-575, 2015.

SUN, Q.N.; FOTHERGILL, A.W.; MCCARTHY, D.I.; RINALDI, M.G.; GRAYBILL, J.R. *In vitro* activities of posaconazole, itraconazole, voriconazole, amphotericin B, and fluconazole against 37 clinical isolates of zygomycetes. *Antimicrob Agents Chemother*. 46, 1581-1582, 2002.

SUNG, D.J.; KIM, J.G.; WON, K.J.; KIM, B. SHIN, H.C.; PARK, J.Y.; BAE, Y.M. Blockade of K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> channels by azole antifungal agents in neonatal rat ventricular myocytes. *Biol Pharm Bull*. 35:1469-1475, 2012.

TABOADA, J. Micoses sistêmicas. In: ETTINGER, S.J., FELDMAN, E.C. Tratado de Medicina Interna Veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2004, p.478-503.

THOMSON, J., TROTT, D. J., MALIK, R., GALGUT, B., MCALLISTER, M. M., NIMMO, J., RENTON, D., & KIDD, S. E. An atypical cause of sporotrichosis in a cat. *Medical Mycology Case Reports*, v. 23, p. 72–76, 2019.

TOTHOVA, C.O.; NAGY, O.; KOVAC, G. Serum proteins and their diagnostic utility in veterinary medicine: a review. *Veterinarni Medicina*. 61, (9): 475–496, 2016.

UEKAMA, K.; HIRAYAMA, F.; IRIE, T. Cyclodextrin Drug Carrier Systems. *Chem Rev*. 30;98(5):2045-2076, 1998.

ÚRBAN-MORLÁN, Z., et al. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles containing cyclosporine by the emulsification-diffusion method. *Int J Nanomedicine*. 5: 611–620, 2010.

USP-NF, 2019. United States Pharmacopeia–National Formulary. Itraconazole Capsules. Disponível em: < [https://www.uspnf.com/sites/default/files/usp\\_pdf/EN/USPNF/revisions/itraconazole-caps-rb-notice-20190531.pdf](https://www.uspnf.com/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/revisions/itraconazole-caps-rb-notice-20190531.pdf)>. Acesso em: 16 de novembro de 2022.

VAN DE VELDE, V.J.; VAN PEER, V.J.; VAN PEER, A.P.; HEYKANTS, J.J.; WOESTENGORGHS, R.J.; DE BEULE, K.L.; CAUWENBERGH, G.F. Effect of food on the pharmacokinetics of a new hydroxypropyl-beta-cyclodextrin formulation of itraconazole. *Pharmacotherapy*. 16, 424-428, 1996.

VAN PEER, A.; WOESTENBORGHS, R.; HEYKANTS, J.; GASPARINI, R.; GAUWENBERGH, G. The effects of food and dose on the oral systemic availability of itraconazole in healthy subjects. *Eur. J. Clin. Pharmacol*. 36, 423-426, 1989.

VERMA, S.; HUEY, B.D.; BURGESS, D.J. Scanning probe microscopy method for nanosuspension stabilizer selection. *Langmuir*. 25(21):12481-12487, 2009.

VERTEBRATE ANIMAL RESEACH, 2020. Substance Administration - Recommended Volumes (Informational Sheet). Disponível em: <https://animal.research.uiowa.edu/oar-informational-sheet-recommended-volumes-administered-substances>. Acesso em: 23 de dezembro de 2021.

VIEIRA, M.R.; MARTINS, M.L.; AFONSO, A.; REGO, F.; CARDOSO, J. Cutaneous alternariosis. *Rev Iberoam Micol.* 15: 97e9, 1998.

WANZHONG, Z.; XUELIANG, Q.; JIANQUO, C. Synthesis and characterization of silver nanoparticles in AOT microemulsion system. *Chem. Phys.* 330, 495–500, 2006.

WATERS. Waters 996 photodiode detector: Peak purity I. What is peak analysis performance perspectives. Modford: Waters Corporation, 1996.

WHITE, T.C.; MARR, K.A.; BOWDEN, R.A. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 382–402, 1998.

WHO. Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals: a road map for neglected tropical diseases 2021–2030. Geneva: World Health Organization; 2020. Accessed 31 March 2022.

WILLEMS, L.; VAN DER GEEST, R.; DE BEULE, K. Itraconazole oral solution and intravenous formulations: a review of pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics.* v. 26, n. 3, 2001.

WILLEMS, L.; VAN DER GEEST, R.; DE BEULE, K. Itraconazole oral solution and intravenous formulations: a review of pharmacokinetics and pharmacodynamics. *J. Clin. Pharm. Ther.* 26, 159-169, 2001.

XU, W.; LING, P.; ZHANG, T. Polymeric Micelles, a Promising Drug Delivery System to Enhance Bioavailability of Poorly Water-Soluble Drugs. *Journal of Drug Delivery.* Volume 2013, 2013.

YIN, X.; DAINTREE, L.S.; DING, S.; LEDGER, D.M.; WANG, B.; ZHAO, W.; QI, J.; WU, W.; HAN, J. Itraconazole solid dispersion prepared by a supercritical fluid technique: preparation, *in vitro* characterization, and bioavailability in beagle dogs. *Drug Des Devel Ther.* 9:2801-10., 2015.

YOO, S.D.; KANG, E.; SHIN, B.S.; JUN, H.; LEE, S.H.; LEE, K.C.; LEE, K.H. Interspecies comparison of the oral absorption of itraconazole in laboratory animals. *Arch Pharm Res.* 25, 387, 2002.

ZEBB, A.; OMER, S.; QURESHIA S.O.; KIM, H.S.; KIM, M.S.; KANGA, J.H.; PARK, J.S.; KIM, J.K. High payload itraconazole-incorporated lipid nanoparticles with modulated release property for oral and parenteral administration. *J Pharm Pharmacol.* 69(8):955-966, 2017.

ZHANG, Y., HAGEN, F., STIELOW, B., RODRIGUES, A.M., SAMERPITAK, K., ZHOU, X., FENG, P., YANG, L., CHEN, M., DENG, S., LI, S., LIAO, W., LI, R., LI, F., MEIS, J. F., GUARRO, J., TEIXEIRA, M., AL-ZAHRANI, H. S., DE CAMARGO, Z. P., ZHANG, L., DE HOOG, G.S. Phylogeography and evolutionary patterns in *Sporothrix* spanning more than 14 000 human and

animal case reports. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, v. 35, n. 1, p. 1–20, 2015.

ZHONG-MIN, O. HIROSHI, Y.; KEISAKU, K. Preparation and optical properties of organic nanoparticles of porphyrin without self-aggregation. *J. Photochem. Photobio. A: Chem.* 189, 2007.

ZHOU, Y.B.; XIAO, Y.Y.; CHAO, J.J.; MA, L. A Novel Itraconazole Pulse Therapy Schedule in the Treatment of *Tinea Capitis* in Children. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 14:1799-1803, 2021.

ZIELKE, M.; CARVALHO, L.F.; SALAME, J.P.; BARBOZA, D.V.; GASPAR; SAMPAIO, L.C.; SAMPAIO, L.C.L. Avaliação do uso de fármacos em animais de companhia sem orientação profissional. *Science and animal health.* 6:29-46, 2018.

ZOETIS, 2019. Telazol®. Disponível em: <[https://www.zoetisus.com/contact/pages/product\\_information/msds\\_pi/pi/telazol.pdf](https://www.zoetisus.com/contact/pages/product_information/msds_pi/pi/telazol.pdf)>. Acesso em: 17 de novembro de 2022.

## ANEXO I

Figura 32: Aprovação do Protocolo CEUA 24/2020.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**CEUA**  
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

**UFMG**

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 24/2020  
Título do projeto: Tratamento e acompanhamento gratuito dos casos felinos como uma medida de combate à esporotricose  
Finalidade: Pesquisa  
Pesquisador responsável: Camilla Stefanie Fonseca de Oliveira  
Unidade: Escola de Veterinária  
Departamento: Departamento de Medicina Veterinária Preventiva

Situação atual: **Decisão Final - Aprovado**

Aprovado Ad Referendum em 30/03/2020. Validade: 30/03/2020 à 29/03/2025.

Belo Horizonte, 30/03/2020.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG  
[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3409-4516  
[www.ufmg.br/etica/ceua](http://www.ufmg.br/etica/ceua) - [ceua@prpq.ufmg.br](mailto:ceua@prpq.ufmg.br)



## ANEXO II

**Figura 33:** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE.

O Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa “Estudo da eficiência do tratamento e acompanhamento gratuito dos casos felinos como uma medida de combate à esporotricose” conduzido pela Escola de Veterinária da UFMG em parceria com a Faculdade de Farmácia da UFMG, sob coordenação da professora Dra. Camila Stefanie Fonseca de Oliveira (professora adjunta de Saúde Pública Veterinária) e subcoordenação da professora Dra. Gisele Assis Castro Goulart (professora associada do Departamento de Produtos Farmacêuticos). Pedimos a sua autorização para a coleta, o depósito, o armazenamento, a utilização e descarte de suabes e imprint em lâmina dos animais. A utilização do material biológico de seu animal está vinculada somente a este projeto de pesquisa ou se Sr. (a) concordar em outros futuros. Nesta pesquisa pretendemos verificar a eficácia do acompanhamento e tratamento gratuito da esporotricose felina como uma medida de combate à esporotricose zoonótica em Belo Horizonte. Para esta pesquisa adotaremos os seguintes procedimentos: realizar o teste para esporotricose no animal em clínica veterinária, coletando suabes ou *imprint* em lâmina, seguido de fornecimento de medicamentos para os animais com diagnóstico positivo, acompanhamento clínico periódico do animal e coleta de dados a respeito do tratamento. Os riscos envolvidos na pesquisa consistem em: aumento do estresse pela contenção durante as consultas com os Médicos Veterinários; Diagnóstico falso-negativo; Diagnóstico falso-positivo; Ausência de resposta ao tratamento de escolha com itraconazol na dosagem de 100 mg/kg; Reação alérgica ao itraconazol; Efeitos colaterais do tratamento com o itraconazol na dosagem de 100 mg/kg; Abandono do tratamento pelo tutor. Os riscos para os tutores dos animais incluídos no estudo consistem em: Fuga de gato durante o transporte até o local das consultas; Desconforto ou exposição vexatória durante a anamnese no acompanhamento da consulta com o Médico Veterinário; Contaminação com o fungo durante o fornecimento do tratamento ou manejo do animal positivo. A pesquisa contribuirá para tratamento dos animais doentes, diagnóstico e prevenção das pessoas em relação à esporotricose, educação das pessoas a respeito da saúde animal, humana e a esporotricose.

Para participar deste estudo o Sr. (a) não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. O Sr. (a) terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar e a qualquer tempo e sem quaisquer prejuízos, pode retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico e dados armazenados, valendo a desistência a partir da data de formalização desta. A sua participação é voluntária, e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que o Sr. (a) é atendido (a) pelo pesquisador, que tratará a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados obtidos pela pesquisa, a partir de seu material biológico, estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. O (A) Sr. (a) não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UFMG, e a outra será fornecida ao Sr. (a). Os dados, materiais e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos (ou até 10 (dez) anos) no LAMICO da Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG e após esse tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resoluções Nº 466/12; 441/11 e a Portaria 2.201 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares), utilizando as informações somente para fins acadêmicos e científicos.

Eu, \_\_\_\_\_, portador do documento de Identidade \_\_\_\_\_ fui informado (a) dos objetivos, métodos, riscos e benefícios da pesquisa “Estudo da eficiência do tratamento e acompanhamento gratuito dos casos felinos como uma medida de combate à esporotricose”, de maneira clara e detalhada e esclareci

minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

( ) Concordo que o material biológico de meu animal seja utilizado somente para esta pesquisa.

( ) Concordo que o material biológico possa ser utilizado em outras pesquisa, mas serei comunicado pelo pesquisador novamente e assinarei outro termo de consentimento livre e esclarecido que explique para que será utilizado o material.

*Rubrica do pesquisador:* \_\_\_\_\_

*Rubrica do participante:* \_\_\_\_\_

Declaro que concordo em participar desta pesquisa. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido assinado por mim e pelo pesquisador, que me deu a oportunidade de ler e esclarecer todas as minhas dúvidas.

Nome completo do participante  
Telefone de contato:

Data

Assinatura do participante

**Nome completo do Pesquisador Responsável: Camila Stefanie Fonseca de Oliveira**  
Escola de Veterinária da UFMG, Campus Pampulha / Belo Horizonte – MG  
Telefones: (31) 3409-2090 / (31) 99704-6563  
E-mail: [sfo.camila@gmail.com](mailto:sfo.camila@gmail.com)

Assinatura do pesquisador responsável  
Data

Nome completo do Pesquisador:  
E-mail:  
Telefone de contato:

Assinatura do pesquisador (mestrando, doutorando)  
Data

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

**COEP-UFMG - Comissão de Ética em Pesquisa da UFMG**  
Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005.  
Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG – Brasil. CEP: 31270-901.  
E-mail: [coep@prpq.ufmg.br](mailto:coep@prpq.ufmg.br). Tel: 34094592.





























## ANEXO X

Compilado de resultados das análises de teor e substâncias relacionadas para as formulações **GT64** e **GT109**, pré e pós esterilização.

**Figura 41:** Resultados de teor para a formulação **GT64** pré e pós-irradiação, respectivamente.

**Pico: Itraconazol**

	Amostra	Pico	Conc. teórica Itraconazol	Units	Height	RT	Area	Teor (%)	Result Id
1	NI_GT64_102/22_T1	Itraconazol	100.00	µg/mL	131993917	41.538	1416922242	102.66	4126
2	NI_GT64_102/22_T2	Itraconazol	100.00	µg/mL	128450319	41.544	1385046859	100.35	4127
3	NI_GT64_102/22_T3	Itraconazol	100.00	µg/mL	125605820	41.548	1349121416	97.75	4128
Mean						41.54	1383696839	100.25	
% RSD						0.01	2.45	2.45	

**Pico: Itraconazol**

	Amostra	Pico	Conc. teórica Itraconazol	Units	Height	RT	Area	Teor (%)	Result Id
1	I_GT64_102/22_T1	Itraconazol	100.00	µg/mL	121220483	41.553	1305539446	94.59	4129
2	I_GT64_102/22_T2	Itraconazol	100.00	µg/mL	120639640	41.564	1302398671	94.36	4130
3	I_GT64_102/22_T3	Itraconazol	100.00	µg/mL	125124810	41.573	1343620702	97.35	4131
Mean						41.56	1317186273	95.43	
% RSD						0.02	1.74	1.74	

**Figura 42:** Resultados de teor para a formulação **GT109** pré e pós-irradiação, respectivamente.

**Pico: Itraconazol**

	Amostra	Pico	Conc. teórica Itraconazol	Units	Height	RT	Area	Teor (%)	Result Id
1	NI_GT109_T1	Itraconazol	100.00	µg/mL	116921287	41.635	1318060825	95.50	4119
2	NI_GT109_T2	Itraconazol	100.00	µg/mL	116373234	41.644	1305010008	94.55	4120
3	NI_GT109_T3	Itraconazol	100.00	µg/mL	131004560	39.899	1319044816	95.57	4132
Mean						41.06	1314038550	95.20	
% RSD						2.45	0.60	0.60	

**Pico: Itraconazol**

	Amostra	Pico	Conc. teórica Itraconazol	Units	Height	RT	Area	Teor (%)	Result Id
1	I_GT109_T1	Itraconazol	100.00	µg/mL	112722987	41.655	1263146682	91.52	4121
2	I_GT109_T2	Itraconazol	100.00	µg/mL	112709098	41.662	1260801939	91.35	4122
3	I_GT109_T3	Itraconazol	100.00	µg/mL	134678720	39.903	1350942095	97.88	4133
Mean						41.07	1291630238	93.58	
% RSD						2.47	3.98	3.98	



Compilado de resultados das análises de teor e substâncias relacionadas para as formulações **GT64** e **GT109**, pré e pós esterilização.

**Figura 43:** Resultados do somatório de impurezas – formulação **GT64** (pré-irradiação) (n=3).

(A) amostra 1. (B) amostra 2. (C) amostra 3.

(A)

	Amostra	Name	Retention Time (min)	Area ( $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$ )
1	NI_GT64_102/22_SR1	Placebo 1	7.017	6937186040.97
2	NI_GT64_102/22_SR1	Placebo 2	13.245	454068208.53
3	NI_GT64_102/22_SR1	Itraconazol	39.664	31768215958.27
Sum				

(B)

	Amostra	Name	Retention Time (min)	Area ( $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$ )
1	NI_GT64_102/22_SR2	Placebo 1	7.007	6959217243.31
2	NI_GT64_102/22_SR2	Placebo 2	13.231	454383226.75
3	NI_GT64_102/22_SR2	Itraconazol	39.659	30812657887.14
Sum				

(C)

	Amostra	Name	Retention Time (min)	Area ( $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$ )
1	NI_GT64_102/22_SR3	Placebo 1	7.005	7019142486.71
2	NI_GT64_102/22_SR3	Placebo 2	13.230	461473489.87
3	NI_GT64_102/22_SR3	Itraconazol	39.651	30636170223.57
Sum				

**Figura 44:** Resultados do somatório de impurezas – formulação **GT64** (pós-irradiação) (n=3).

(A) amostra 1. (B) amostra 2. (C) amostra 3.

(A)

	Amostra	Name	Retention Time (min)	Area ( $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$ )	(%)
1	I_GT64_102/22_SR1	Placebo 1	7.010	6919198217.10	
2	I_GT64_102/22_SR1	Placebo 2	13.234	1644037247.03	
3	I_GT64_102/22_SR1	Placebo 6	33.792	36656682.82	
4	I_GT64_102/22_SR1	Placebo 7	35.562	35327130.50	
5	I_GT64_102/22_SR1	RRT- 0.896	36.728	52201323.87	0.15
6	I_GT64_102/22_SR1	Itraconazol	39.639	31175043202.77	
Sum					0.15

(B)

	Amostra	Name	Retention Time (min)	Area ( $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$ )	(%)
1	I_GT64_102/22_SR2	Placebo 1	7.008	6966429756.45	
2	I_GT64_102/22_SR2	Placebo 2	13.233	1636958776.14	
3	I_GT64_102/22_SR2	RRT- 0.896	36.720	52548745.32	0.15
4	I_GT64_102/22_SR2	Itraconazol	39.633	31205284574.63	
Sum					0.15

(C)

	Amostra	Name	Retention Time (min)	Area ( $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$ )	(%)
1	I_GT64_102/22_SR3	Placebo 1	7.009	6974834515.96	
2	I_GT64_102/22_SR3	Placebo 2	13.238	1849930102.97	
3	I_GT64_102/22_SR3	Placebo 7	35.547	36407176.79	
4	I_GT64_102/22_SR3	RRT- 0.896	36.714	59406525.47	0.17
5	I_GT64_102/22_SR3	Itraconazol	39.624	31605409089.70	
Sum					0.17

Compilado de resultados das análises de teor e substâncias relacionadas para as formulações **GT64** e **GT109**, pré e pós esterilização.

**Figura 45:** Resultados do somatório de impurezas – formulação **GT109** (pré-irradiação) (n=3).

(A) amostra 1. (B) amostra 2. (C) amostra 3.

(A)

	Amostra	Name	Retention Time (min)	Area ( $\mu\text{V}^{\circ}\text{sec}$ )
1	NI_GT109_SR1	Placebo 1	6.992	6783155677.23
2	NI_GT109_SR1	Placebo 2	13.204	600970450.35
3	NI_GT109_SR1	Itraconazol	41.373	26137060973.07
Sum				

(B)

	Amostra	Name	Retention Time (min)	Area ( $\mu\text{V}^{\circ}\text{sec}$ )
1	NI_GT109_SR2	Placebo 1	6.985	6761840548.42
2	NI_GT109_SR2	Placebo 2	13.195	592515032.45
3	NI_GT109_SR2	Itraconazol	41.349	26129633329.53
Sum				

(C)

	Amostra	Name	Retention Time (min)	Area ( $\mu\text{V}^{\circ}\text{sec}$ )
1	NI_GT109_SR3	Placebo 1	6.998	7100097450.63
2	NI_GT109_SR3	Placebo 2	13.229	654250707.25
3	NI_GT109_SR3	Itraconazol	39.623	31660557762.40
Sum				

**Figura 46:** Resultados do somatório de impurezas – formulação **GT109** (pós-irradiação) (n=3).

(A) amostra 1. (B) amostra 2. (C) amostra 3.

(A)

	Amostra	Name	Retention Time (min)	Area ( $\mu\text{V}^{\circ}\text{sec}$ )	(%)
1	I_GT109_SR1	Placebo 1	6.978	6897536973.12	
2	I_GT109_SR1	Placebo 2	13.181	1999940639.51	
3	I_GT109_SR1	RRT- 0.933	38.073	51561040.72	0.15
4	I_GT109_SR1	Itraconazol	41.337	30504860745.36	
Sum					0.15

(B)

	Amostra	Name	Retention Time (min)	Area ( $\mu\text{V}^{\circ}\text{sec}$ )	(%)
1	I_GT109_SR2	Placebo 1	6.991	6620109247.06	
2	I_GT109_SR2	Placebo 2	13.204	1917902627.76	
3	I_GT109_SR2	RRT- 0.933	38.066	50304997.64	0.15
4	I_GT109_SR2	Itraconazol	41.337	29671741574.79	
Sum					0.15

(C)

	Amostra	Name	Retention Time (min)	RRT-	Area ( $\mu\text{V}^{\circ}\text{sec}$ )	(%)
1	I_GT109_SR3	Placebo 1	7.005		6752298616.79	
2	I_GT109_SR3	Placebo 2	13.226		2031597886.57	
3	I_GT109_SR3	RRT- 0.933	36.709	0.926	52234457.90	0.15
4	I_GT109_SR3	Itraconazol	39.628		30212100331.87	
Sum						0.15