

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA

MARIE GABRIELE SANTIAGO

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO CLÍNICA  
DE FORMULAÇÕES CARREGADAS COM ITRACONAZOL PARA O  
TRATAMENTO TÓPICO DA ESPOROTRICOSE FELINA**

Belo Horizonte

2021

MARIE GABRIELE SANTIAGO

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO CLÍNICA  
DE FORMULAÇÕES CARREGADAS COM ITRACONAZOL PARA O  
TRATAMENTO TÓPICO 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

**Co-orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dra. Raquel Virgínia Vilela

**Co-orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dra. Camila Stefanie Fonseca de Oliveira

Belo Horizonte

2021

S235d Santiago, Marie Gabriele.  
Desenvolvimento, caracterização e avaliação clínica de formulações carregadas com itraconazol para o tratamento tópico da esporotricose felina / Marie Gabriele Santiago. – 2021.  
106 f. : il.

Orientadora: Gisele Assis Castro Goulart.  
Coorientadoras: Raquel Virgínia Rocha Vilela e Camila Stefanie Fonseca de Oliveira.

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

1. Esporotricose – Teses. 2. Itraconazol – Teses. 3. Medicamentos – Formas farmacêuticas – Teses. 4. Medicamentos – Avaliação – Teses – Teses. 5. Soluções farmacêuticas – Teses. I. Goulart, Gisele Assis Castro. II. Vilela, Raquel Virgínia Rocha. III. Oliveira, Camila Stefanie Fonseca de. 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

### **ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DA ALUNA MARIE GABRIELE SANTIAGO**

Realizou-se, no dia 28 de junho de 2021, às 09:00 horas, por videoconferência, a 352ª defesa de dissertação, intitulada *DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO CLÍNICA DE FORMULAÇÕES CARREGADA COM ITRACONAZOL PARA O TRATAMENTO TÓPICO DA ESPOROTRICOSE FELINA*, apresentada por MARIE GABRIELE SANTIAGO, número de registro 2019672264, graduada no curso de FARMACIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Gisele Assis d Castro Goulart - Orientadora (UFMG), Prof(a). Raquel Virgínia Rocha Vilela - Coorientadora (UFMG), Prof(a). Camila Stefanie Fonseca de Oliveira - Coorientadora (UFMG), Prof(a). Danielle Ferreira de Magalhães Soares (UFMG), Prof(a). Marta Marques Gontijo de Aguiar (UFMG).

A Comissão considerou a dissertação:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 28 de junho de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Gisele Assis Castro Goulart, Professora do Magistério Superior**, em 28/06/2021, às 12:23, 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 **Marta Marques Gontijo de Aguiar, Professora do Magistério Superior**, em 28/06/2021, às 12:24,



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 **Danielle Ferreira de Magalhaes Soares, Professora do Magistério Superior**, em 07/07/2021, às 06:55, 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 **Raquel Virginia Rocha Vilela, Professora do Magistério Superior**, em 07/07/2021, às 10:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Ata FARMACIA-SECCPGCFA 0802643 SEI 23072.232829/2021-64 / pg. 1



Documento assinado eletronicamente por **Camila Stefanie Fonseca de Oliveira, Membro**, em 07/07/2021, às 12:20, 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?](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?)

[acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](#), informando o código verificador **0802643** e o código CRC **A4308367**.

Referência: Processo nº 23072.232829/2021-64 SEI nº 0802643

Ata FARMACIA-SECCPGCFA 0802643 SEI 23072.232829/2021-64 / pg. 2

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus pela minha saúde e por ter permitido que eu trilhasse caminhos tão providenciais. A todo momento senti seu amor por mim.

Aos meus amados pais, Renata e Sérgio, que sempre batalharam pela minha educação e me permitiram viver em um lar de calma, amor e harmonia. Dedico, de todo meu coração, esse trabalho e todas as minhas conquistas a vocês.

À professora Gisele, por todo carinho, amizade e dedicação. Serei eternamente grata por ter me orientado e influenciado tão positivamente na minha vida profissional e pessoal, me ajudando sempre a “trabalhar com a solução e não com o problema”.

Ao meu querido Bruno, por tanto companheirismo, apoio e acolhimento nesses últimos anos. Sempre me lembrando, com toda calma de sempre, que eu estava no melhor caminho possível. A caminhada foi melhor porque você estava junto comigo.

Aos meus queridos amigos e amigas que, nesses tempos de afastamento, sempre se fizeram tão presentes. Em especial, agradeço ao amado Márcio, pelo carinho, amizade e risadas de todos os dias. Às “meninas de Gisele”: Cris, Carol Faria, Carol Dohanik, Bruna e Yamara, pelo companheirismo nessa etapa e conquista. Em especial à Carol Dohanik e à Bruna, pelos vários dias de auxílio no desenvolvimento do método analítico por CLAE. Foi muito importante partilhar com vocês!

À minha família, tias, tios, primos e primas que sempre torceram e rezaram muito por mim. Em especial, à minha madrinha Fernanda, que sempre esteve ao meu lado com todo amor e dedicação.

Às professoras Camila e Raquel que, com todo amor pelo que fazem, tanto contribuíram para o meu trabalho e me permitiram participar e levar cuidado aos animais e aos pacientes.

A todos os professores, técnicos e colegas do LTF pela convivência harmônica nos últimos anos. Aos colegas da veterinária, do projeto de esporotricose felina, por toda recepção e disponibilidade. À UFMG, pela estrutura e por ter me permitido fundamentar todo esse aprendizado. Ao CNPq pelo auxílio financeiro. E aos parceiros que tanto contribuíram para execução desse projeto.

## RESUMO

A esporotricose é uma infecção fúngica endêmica no Brasil que pode acometer animais e humanos, apresentando risco de morte em indivíduos imunocomprometidos, além de afastamento social decorrente das lesões aparentes. O alto número de casos vem sendo associado à transmissão zoonótica decorrente do contato com gatos contaminados, que devem ser tratados adequadamente para que haja o controle da infecção. Atualmente, a administração oral de cápsulas de itraconazol (ITZ) é a primeira escolha para o tratamento da esporotricose, tanto em animais como em humanos. Entretanto, é um tratamento que necessita de dedicação por parte dos tutores. Como a maioria dos animais apresenta lesões cutâneas com alta carga fúngica, a aplicação de uma formulação tópica carregada com ITZ pode ser uma alternativa eficaz para melhorar o tratamento. No entanto, não há no mercado nacional uma formulação tópica de ITZ. Assim, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver, caracterizar e avaliar a eficácia clínica de formulações tópicas carregadas com ITZ para o tratamento da esporotricose felina. Foram desenvolvidas formulações oleosas fluidas e poliméricas viscosas carregadas com 1% p/p de ITZ. Para o desenho experimental, foi proposta a revisão da literatura e avaliação da solubilidade mínima do ITZ em diferentes excipientes. As formulações foram avaliadas quanto ao sensorial, aspectos macro e microscópicos, perfil reológico e de espalhabilidade, além de teor de ITZ por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE). Nas formulações oleosas, o excipiente X1 foi estabelecido como o mais crítico na manutenção do ITZ solubilizado. Na formulação polimérica, a presença do polímero X26 propiciou a formação de uma rede polimérica coexistindo com micelas poliméricas que mantiveram o ITZ solubilizado por mais de 30 dias. Ambas as formulações apresentaram viscosidade e espalhabilidade adequadas para o tratamento da esporotricose felina. A avaliação clínica das formulações foi conduzida, inicialmente, em um caso piloto de um gato com lesão extensa, onde a aplicação de uma gota por dia da formulação oleosa tópica associada ao ITZ oral propiciou a cura do animal; e posteriormente em estudo clínico com 80 gatos durante 5 meses, onde a associação da formulação tópica polimérica, com o mesmo esquema posológico, apresentou eficácia, maior velocidade de cura e menos efeitos colaterais nos animais.

Palavras-chave: esporotricose zoonótica; esporotricose felina; itraconazol; tratamento tópico; eficácia

## ABSTRACT

Sporotrichosis is a fungal disease endemic in Brazil that can affect animals and humans, presenting a risk of death in immunocompromised individuals, in addition to social withdrawal due to apparent injuries. The high number of cases has been associated with zoonotic transmission due to contact with infected cats. For an effective control of the disease it is important to treat the feline population properly. Currently, oral administration of itraconazole (ITZ) capsules is the first choice for the treatment of sporotrichosis, both in animals and in humans. However, it is an expensive and time-consuming treatment. As most animals present skin lesions with a high fungal load, a topical formulation loaded with ITZ can be an effective alternative to improve the treatment of sporotrichosis lesions. However, there is no topical formulation loaded with ITZ in the national market. Thus, the present study aimed to develop, characterize and evaluate the clinical efficacy of the developed topical formulations loaded with ITZ in the treatment of feline sporotrichosis. It was developed oily and polymeric formulations with 1% w/w ITZ. For the experimental design, was proposed a literature review and minimal solubility assay of ITZ in different excipients. Formulations were characterized by the sensorial, macro and microscopic aspects, rheological and spreadability profiles, and content of ITZ by high performance liquid chromatography (HPLC). The excipient X1 was established as the most critical for the maintenance of ITZ solubilized. For the polymeric formulation, the polymer X26 allowed the formation of a network that coexisted with polymeric micelles that keep the ITZ solubilized for more than 30 days. Both formulations presented appropriate viscosity and spreadability for the treatment of feline sporotrichosis. The clinical evaluation of the formulations was initially conducted in a pilot case of a cat with an extensive lesion, where the application of one drop per day of the topical oily formulation associated with oral ITZ provided the animal's cure; and later in a clinical study in felines, where the association of the polymeric topical formulation, with the same dosage as the oil, proved to be effective, with a faster cure and less side effects in animals.

Key words: zoonotic sporotrichosis; feline sporotrichosis; itraconazole; topical treatment; effectiveness

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Fotografia de microscopia óptica da fase filamentosa (A) e da fase leveduriforme (B) de <i>Sporothrix</i> spp. ....	16
<b>Figura 2:</b> Rotas de transmissão de esporotricose humana e animal .....	17
<b>Figura 3:</b> Distribuição e carga relativa de esporotricose no mundo .....	18
<b>Figura 4:</b> Ocorrência de esporotricose felina e transmissão zoonótica por estados, no Brasil. ....	19
<b>Figura 5:</b> Aspecto macroscópico de culturas de <i>Sporothrix</i> spp .....	21
<b>Figura 6:</b> Tipos de lesão e manifestação clínica da esporotricose felina .....	22
<b>Figura 7:</b> Lesões esporotricose humana .....	25
<b>Figura 8:</b> Estrutura química do itraconazol .....	26
<b>Figura 9:</b> Esquema do mecanismo de ação do itraconazol na membrana celular de fungos .....	27
<b>Figura 10:</b> Fluxograma de preparo das formulações poliméricas (Rota A) e oleosas (Rota B) carregadas com itraconazol (ITZ) .....	35
<b>Figura 11:</b> Caso clínico de gato macho com esporotricose resgatado no campus Pampulha da UFMG .....	40
<b>Figura 12:</b> Quadro resumo com as variáveis analisadas no estudo clínico e suas respectivas categorias de respostas .....	42
<b>Figura 13:</b> Microscopia de luz polarizada (aumento de 200x) ilustrando a morfologia dos cristais de itraconazol em água (A) e ausência desses cristais nas soluções de X1 (B), X3 (C), em X2 (D) e X8 (E) .....	43
<b>Figura 14:</b> Aspecto macroscópico das formulações S1, S6 e S7 após a produção (0h) e após 24h .....	44
<b>Figura 15:</b> Aspecto macroscópico das formulações S2, S3 e S4 após a produção (0h) e após 24h .....	46
<b>Figura 16:</b> Influência do X9 em diferentes concentrações (colunas laranjas) versus a retirada dos óleos vegetais no tempo até o aparecimento de precipitado de itraconazol .....	47
<b>Figura 17:</b> Aspecto macroscópico da formulação S54 .....	48
<b>Figura 18:</b> Influência da concentração do X1 na estabilização do itraconazol em solução .....	49

<b>Figura 19:</b> Aspecto microscópico das formulações S56-S58 S61-S62, logo após seu preparo e após 24h .....	59
<b>Figura 20:</b> Formação de precipitado de itraconazol nas formulações S14 e S16, em um mesmo intervalo de tempo .....	51
<b>Figura 21:</b> Formulações S29 a S32 após seu preparo (0h) e após precipitação (7 dias) .....	51
<b>Figura 22:</b> Aspecto visual das formulações S79 e S70 após o preparo (t = 0h) e após 1 hora e 48 horas, respectivamente .....	52
<b>Figura 23:</b> Relação entre o tempo de aparecimento de precipitado de itraconazol e a concentração de X5 em diferentes formulações .....	53
<b>Figura 24:</b> Impacto das diferentes concentrações do X5 na manutenção do itraconazol em solução em formulações com concentrações fixas de X1 (15% p/p) e X3 (5% p/p) .....	54
<b>Figura 25:</b> Formulações S8 e S10 contendo, respectivamente, 5 e 10% p/p de X2 após 24h do seu preparo .....	56
<b>Figura 26:</b> Variação na estabilização do ITZ em diferentes formulações contendo 10% p/p de X2 .....	56
<b>Figura 27:</b> Influência da concentração de X2 no tempo de precipitação do itraconazol em diferentes composições de formulações .....	57
<b>Figura 28:</b> Comparativo entre a relação da concentração de X11 (% p/p) e o tempo até aparecimento de precipitado de itraconazol em diferentes formulações .....	58
<b>Figura 29:</b> Aspecto macroscópico das formulações S80, S81, S84, S85, S86, S87, S88 e S89 logo após seu preparo .....	58
<b>Figura 30:</b> Aspecto macro e microscópico das formulações S97, S101, S102 e S103. Na seta vermelha destaca-se a formação de precipitado no fundo do frasco .....	59
<b>Figura 31:</b> Presença de cristais de itraconazol nas formulações S91 e S92 observados em microscópio de luz polarizada, nos tempos 0 e 24h .....	60
<b>Figura 32:</b> Aspecto macroscópico das formulações S92 e S94. Na seta amarela destaca-se a separação de fases e na seta vermelha destaca-se a formação de precipitado .....	60

<b>Figura 33:</b> Comparação entre a influência do X13 e X6 no tempo de aparecimento de precipitado de itraconazol (formulações S51, S52, S53 e S54).	61
<b>Figura 34:</b> Relação não-linear entre a concentração de X12 e o número de dias até a identificação de itraconazol precipitado nas formulações .....	62
<b>Figura 35:</b> Relação entre concentração de X16 e tempo até identificação de itraconazol .....	64
<b>Figura 36:</b> Aspecto macro e microscópico da formulação S108 logo após seu preparo (t= 0h) e após 30 dias .....	64
<b>Figura 37:</b> Aspecto macro e microscópico das formulações S93, S95, S94 e S102, com diferentes concentrações de X17, após 15 dias de preparo .....	65
<b>Figura 38:</b> Influência da concentração do X20 no aparecimento de precipitado de itraconazol nas formulações S2, S3, S14, S15, S17, S23 e S31 .....	66
<b>Figura 39:</b> Influência da concentração de X7 e o aparecimento de precipitado de itraconazol em diferentes formulações .....	66
<b>Figura 40:</b> Influência da concentração do X4 em concentrações de 2, 3 e 4% p/p no aparecimento de precipitado de itraconazol em diferentes formulações ..	67
<b>Figura 41:</b> Influência da concentração do X19 frente ao tempo de aparecimento de ITZ precipitado .....	67
<b>Figura 42:</b> Cromatogramas obtidos em diferentes condições de fase móvel ...	68
<b>Figura 43:</b> Curva obtida por regressão linear pelo método de CLAE para análise de itraconazol. Destacam-se a equação e os coeficientes de correlação (R) e determinação (R <sup>2</sup> ) .....	69
<b>Figura 44:</b> Aspecto macroscópico das formulações S1, S47 e S86 após 14, 11 e 7 meses de preparo .....	70
<b>Figura 45:</b> Cromatogramas obtidos para a formulação oleosa sem itraconazol (A) e para as formulações S1 (B), S47 (C) e S86 (D) .....	71
<b>Figura 46:</b> Valores obtidos para os fatores resposta espalhabilidade e viscosidade no planejamento experimental de misturas do tipo simplex lattice....	72
<b>Figura 47:</b> Gráficos mostrando as relações obtidas para viscosidade e % de itraconazol solubilizado nas formulações S114-S121, frente à variação nas concentrações de X1 e X10 .....	73
<b>Figura 48:</b> Imagens da formulação S108 obtida por microscopia eletrônica de varredura (A-D) .....	75

<b>Figura 49:</b> Ilustração esquemática da interação e organização do itraconazol e excipientes na formulação polimérica S108 .....	75
<b>Figura 50:</b> Curvas de fluxo da formulação S108 carregada com itraconazol .....	77
<b>Figura 51:</b> Evolução clínica do animal tratado com o ITZ tópico .....	78
<b>Figura 52:</b> Evolução clínica de dois gatos (A e B) diagnosticados com esporotricose, tratados com a formulação tópica de itraconazol .....	79
<b>Figura 53:</b> Perfil de distribuição do tempo de tratamento de acordo com o tipo de tratamento (oral ou oral + tópico) e a cura .....	80

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Posologia dos fármacos comumente utilizados no Brasil para tratamento da esporotricose felina. <i>Fonte:</i> Adaptado de Gremião <i>et al.</i> , 2020a .....	23
<b>Tabela 2:</b> Excipientes selecionados para avaliação da solubilidade mínima do itraconazol .....	33
<b>Tabela 3:</b> Tabela de termos descritivos da solubilidade .....	33
<b>Tabela 4 -</b> Planejamento experimental de misturas do tipo <i>simplex lattice</i> para dois componentes (X1 e X10) .....	35
<b>Tabela 5:</b> Solubilidade mínima do itraconazol em diferentes excipientes grau farmacêutico .....	42
<b>Tabela 6:</b> Relação entre a formulação e a quantidade de dias até o aparecimento de ITZ precipitado .....	47
<b>Tabela 7:</b> Quantidade de itraconazol solubilizado, espalhabilidade e viscosidade das formulações S1, S47 e S86 após alguns meses de preparo .....	71
<b>Tabela 8:</b> Quantidade de itraconazol solubilizado (%) nas formulações oleosas desenvolvidas no planejamento experimental (S114-S121) .....	73
<b>Tabela 9:</b> Resumo da caracterização da formulação S108 (n=3, média $\pm$ desvio-padrão) para a quantidade de itraconazol precipitado (%), espalhabilidade (cm) e viscosidade (cP) .....	76
<b>Tabela 10:</b> Avaliação dos índices de cura e óbitos resultantes do tratamento de felinos infectados com esporotricose e tratados com o itraconazol oral associado ou não ao tratamento tópico .....	80

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	13
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	14
2.1 <i>Infecções fúngicas</i>	14
2.2 <i>Esporotricose</i>	15
2.2.1 <i>Etiologia e patogênese</i>	15
2.2.2 <i>Transmissão</i>	16
2.2.3 <i>Epidemiologia</i>	18
2.2.4 <i>Diagnóstico</i>	20
2.2.5 <i>Manifestações clínicas e tratamento</i>	22
2.2.5.1 <i>Esporotricose felina</i>	22
2.2.5.2 <i>Esporotricose humana</i>	24
2.3 <i>Itraconazol</i>	26
<b>3 OBJETIVOS</b>	30
3.1 <i>Objetivos gerais</i>	30
3.2 <i>Objetivos específicos</i>	30
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	31
4.1 <i>Materiais</i>	31
4.2 <i>Métodos</i>	31
4.2.1 <i>Estudos de pré-formulação</i>	31
4.2.1.1 <i>Seleção de excipientes grau farmacêutico</i>	31
4.2.1.2 <i>Avaliação da solubilidade mínima do itraconazol em diferentes excipientes</i>	32
4.2.2 <i>Desenvolvimento da formulação</i>	34
4.2.2.1 <i>Planejamento experimental de misturas</i>	35
4.2.3 <i>Construção da curva dose resposta do ITZ</i>	36
4.2.3.1 <i>Avaliação da seletividade</i>	36
4.2.3.2 <i>Linearidade</i>	36
4.2.3.3 <i>Limites de detecção e quantificação</i>	37
4.2.4 <i>Cálculo de teor do ITZ nas formulações</i>	37
4.2.5 <i>Microscopia eletrônica de varredura</i>	38
4.2.6 <i>Microscopia óptica de luz polarizada</i>	38
4.2.7 <i>Avaliação macroscópica e organoléptica</i>	38
4.2.8 <i>Avaliação da viscosidade</i>	39
4.2.9 <i>Avaliação da espalhabilidade</i>	39
4.2.10 <i>Avaliação clínica da eficácia em felinos infectados com esporotricose</i>	39
4.2.10.1 <i>Caso piloto</i>	39
4.2.10.2 <i>Estudo clínico em felinos</i>	40
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	42
5.1 <i>Avaliação da solubilidade mínima do itraconazol em diferentes excipientes</i>	42
5.2 <i>Desenvolvimento da formulação e seleção dos excipientes</i>	44

5.2.1 Óleos vegetais .....	44
5.2.2 X1 .....	48
5.2.3 X3 .....	50
5.2.4 X8 .....	52
5.2.5 X5 .....	53
5.2.6 X2 .....	55
5.2.7 X11 .....	57
5.2.8 Surfactantes .....	59
5.2.9 X12 .....	61
5.2.10 Polímeros com propriedades surfactantes .....	62
5.2.11 Outros excipientes .....	65
5.3 Desenvolvimento do método analítico por cromatografia a líquido de alta eficiência para quantificação do itraconazol nas formulações .....	68
5.3.1 Avaliação da seletividade .....	68
5.3.2 Linearidade .....	69
5.3.3 Limites de detecção e quantificação .....	70
5.4 As formulações mais promissoras .....	70
5.4.1 Formulações oleosas .....	70
5.4.1.1 Planejamento de misturas .....	72
5.4.2 Formulação polimérica .....	74
5.5 Avaliação clínica da eficácia das formulações desenvolvidas em felinos infectados com esporotricose .....	77
5.5.1 Piloto 1 .....	77
5.5.2 Estudo clínico em felinos .....	78
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>81</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>82</b>
ANEXO 1 .....	97
ANEXO 2 .....	103
ANEXO 3 .....	104
ANEXO 4 .....	106

## 1. INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma doença endêmica no Brasil, sendo considerada hiperendemia na cidade do Rio de Janeiro e outras cidades, devido à crescente transmissão zoonótica, sendo observado um número crescente de casos no Brasil desde os anos 2000 (BARROS *et al.*, 2010; ALZUGUIR *et al.*, 2016; GREMIÃO *et al.*, 2020). Apesar do risco de morte de humanos estar associado a indivíduos imunocomprometidos, há um custo social decorrente das lesões aparentes, que implicam em alterações na autoestima do paciente, afastamento das atividades de integração e sofrimento psicológico (PETER *et al.*, 2016).

Atualmente a principal rota de transmissão da doença acontece pelo contato com gatos contaminados. Portanto, é importante que a população felina seja submetida a tratamento adequado para que o controle da infecção seja eficaz, diminuindo as transmissões saprozoônica e zoonótica (GREMIÃO *et al.*, 2015).

A administração oral de cápsulas de itraconazol (ITZ) é a primeira escolha para o tratamento da esporotricose felina no Brasil e no mundo (ROSSI *et al.*, 2013; NAKASU *et al.*, 2020). Porém, apesar de eficaz, esse tratamento apresenta custo elevado e efeitos colaterais, que ampliam os gastos veterinários. Adicionalmente, o tempo de tratamento, que pode variar de 1 a 12 meses, faz com que 30 a 40% dos tutores abandonem o tratamento de seus animais (LLORET *et al.*, 2013; GREMIÃO *et al.*, 2020), ou abandonem os animais nas ruas, aumentando a possibilidade de transmissão, ou ainda desistam do tratamento e encaminhem o animal para eutanásia (BARROS *et al.*, 2010).

Como boa parte dos animais apresentam como manifestação clínica lesões cutâneas com alta carga leveduriforme de *Sporothrix* spp. (GREMIÃO *et al.*, 2015; GREMIÃO *et al.*, 2020), a aplicação de um medicamento tópico contendo ITZ pode ser uma alternativa eficaz, capaz de reduzir os efeitos colaterais, aumentar a adesão dos tutores ao tratamento, proporcionar uma resposta mais rápida do que a administração de ITZ por via oral e, conseqüentemente, reduzir o surgimento de novos casos.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver, caracterizar e avaliar a eficácia clínica de formulações tópicas de ITZ para o tratamento da esporotricose felina.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Infecções fúngicas

As infecções fúngicas são condições clínicas causadas por fungos e podem apresentar evolução benigna, com lesões superficiais que evoluem para cura, ou evoluir para quadros mais complicados, como infecção sistêmica em pacientes imunocomprometidos (MARTINEZ-ROSSI *et al.*, 2017; NWEZE & EKE, 2017). A incidência dessas infecções varia de acordo com as condições socioeconômicas, com o local de moradia, com hábitos culturais e com o número de indivíduos susceptíveis (GIACOMAZZI *et al.*, 2015).

A incidência mundial das infecções fúngicas tem aumentado nos últimos anos, bem como o risco do desenvolvimento da forma sistêmica (LOCKHART & GUARNER, 2019). Um dos principais fatores responsáveis por esse aumento está relacionado ao sistema imunológico do hospedeiro, sendo muitos relatos associando infecções fúngicas graves à imunoterapia no tratamento do câncer, às doenças autoimunes, ao uso de imunomoduladores no transplante de órgãos e de fluidos entre pacientes e ao uso de medicamentos para tratar doenças inflamatórias crônicas (FRIEDMAN & SCHWARTZ, 2019; LOCKHART & GUARNER, 2019). Além disso, deve-se considerar também os mecanismos dos patógenos que, cada vez mais, têm apresentado resistência aos antifúngicos (WU *et al.*, 2017).

Apesar da relevância e gravidade da manifestação sistêmica, as infecções fúngicas ainda são consideradas doenças negligenciadas (RODRIGUES, 2019). Segundo o Fundo Global de Ações contra Infecções Fúngicas (GAFFI- *Global Action Fund for Fungal Infections*), estima-se que no mundo cerca de 300 milhões de pessoas manifestem alguma lesão fúngica por ano e, dessas, cerca de 1,5 milhões evoluem para óbito. Isto significa que aproximadamente 150 pessoas morrem por hora devido à infecção fúngica (BONGOMIN *et al.*, 2017; GAFFI, 2021). No Brasil, estima-se que mais de 3,8 milhões de indivíduos em tratamento contra o câncer, submetidos a transplante de órgãos, com histórico de asma, tuberculose, HIV e residentes em áreas endêmicas, manifestam infecções fúngicas graves (GIACOMAZZI *et al.*, 2015).

Além de ser um problema de saúde pública, as infecções fúngicas também representam um problema econômico, uma vez que o tratamento pode chegar a 400 mil reais por paciente para o sistema de saúde, como alguns tratamentos com

anfotericina B (BORBA *et al.*, 2018). No entanto, apesar de alguns estados brasileiros como Minas Gerais solicitarem notificação de casos (Resolução SES 6532, 2018), em âmbito nacional, nenhuma infecção fúngica é de notificação compulsória no país (BRASIL, 2020), o que pode sugerir que o número de infectados e os gastos com tratamentos sejam ainda maiores.

No Brasil, fungos da espécie *Cryptococcus neoformans* constituem os principais agentes relacionados a óbitos em pacientes imunodeprimidos acometidos com infecções sistêmicas (GIACOMAZZI *et al.*, 2015). Entretanto, outras micoses, como a esporotricose, têm sido associadas a altos índices de mortalidade e afastamento social e empregatício (RODRIGUES & ALBUQUERQUE, 2018).

## 2.2 Esporotricose

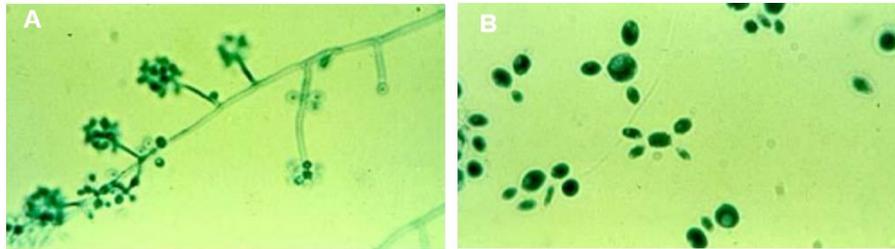
### 2.2.1 Etiologia e patogênese

A esporotricose é uma infecção fúngica crônica que acomete tanto humanos quanto animais, sendo causada por fungos termo dimórficos do gênero *Sporothrix* (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017; FERNANDES *et al.*, 2018). A etiologia do gênero *Sporothrix* constitui um complexo parasitário de diversas espécies. De maneira geral, de acordo com análises filogenéticas, classificam-se 51 táxons, divididos entre clado clínico (maioria patógenos humanos), onde se encontram as espécies *S. schenckii*, *S. lurieri*, *S. globosa*, *S. mexicana* e *S. brasiliensis*; e clado ambiental, onde se encontram as espécies *S. pallida*, *S. candida*, *S. inflata* (ZHOU *et al.*, 2014; OROFINO-COSTA *et al.*, 2017).

As espécies *S. brasiliensis* e *S. schenckii* são as que apresentam maior potencial de virulência para o ser humano, sendo a primeira restrita ao território brasileiro (FERREIRA, 2016). Em áreas endêmicas como Austrália, África do Sul e América do Norte, o principal agente etiológico é o *S. schenckii*. Enquanto na Ásia, o *S. globosa* é responsável pela maioria dos casos de esporotricose em humanos (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017). Já em animais, os principais agentes causadores da esporotricose são as espécies *S. schenckii*, *S. humicola* e *S. brasiliensis*, sendo essa última o principal agente etiológico da infecção no Brasil (GREMIÃO *et al.*, 2020).

Uma das principais características desses fungos é seu dimorfismo térmico. São encontrados na forma saprofitica filamentosa em cultura *in vitro* e solos ricos em

matéria orgânica (temperatura aproximada de 25 °C e umidade elevada); e na forma leveduriforme (parasitária) em cultura *in vitro*, no homem e em outros animais (temperatura entre 35-37 °C) (**Figura 1**) (LACAZ *et al.*, 2002).



**Figura 1:** Microscopia óptica da fase filamentosa (A) e da fase leveduriforme (B) de *Sporothrix* spp.

Fonte: Lacaz, 1998.

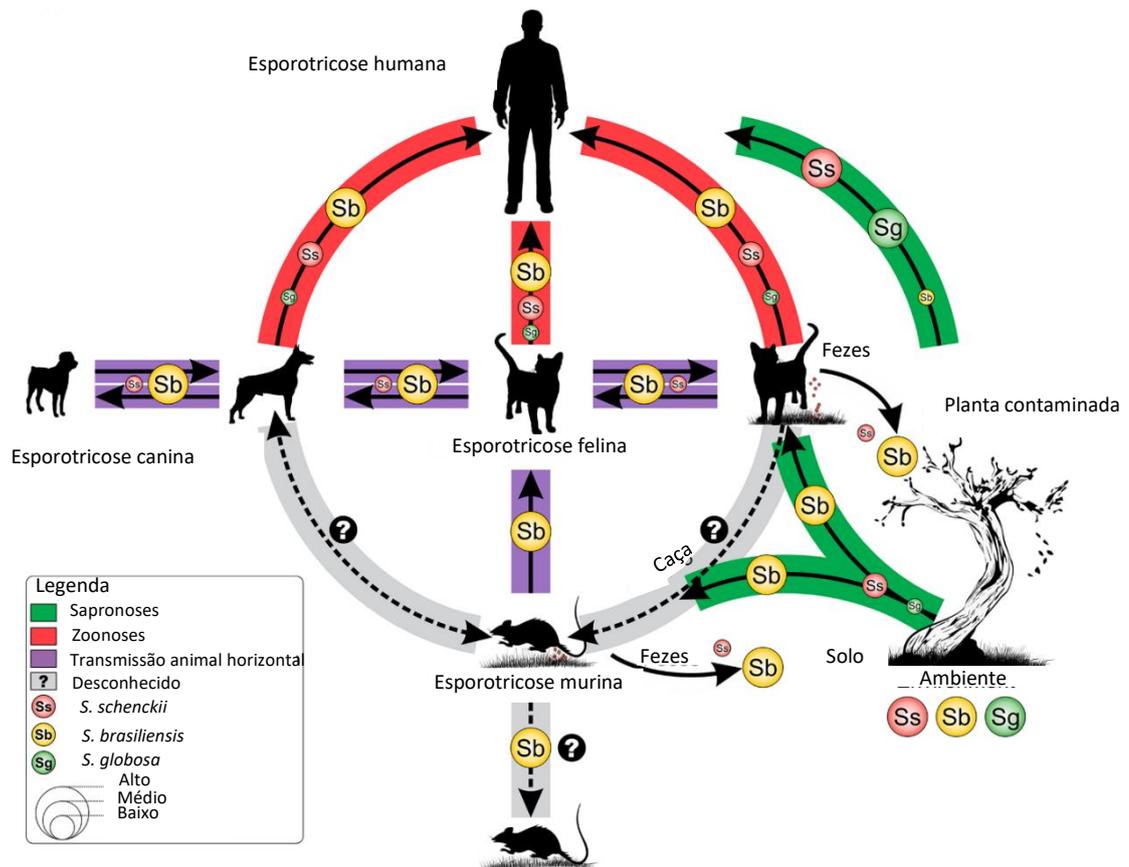
Segundo Chakrabarti e colaboradores (2015), os fungos *Sporothrix* spp. destacam-se de outras espécies dimórficas por apresentarem ampla distribuição geográfica e características epidemiológicas, clínicas e ecológicas diferentes, variando de acordo com a região em que a doença ocorre. Adicionalmente, dentro deste grupo, são os únicos fungos que não apresentam a via pulmonar como a principal porta de infecção e é o único com importante transmissão zoonótica.

A mudança na morfologia deste fungo é crucial no processo de infecção em mamíferos. Frente à mudança de temperatura, as espécies do clado clínico transformam-se com maior facilidade que as do clado ambiental, produzindo uma maior quantidade de células leveduriformes e com maior patogenicidade (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017; HE *et al.*, 2021). Outro fator importante na virulência dos fungos do gênero *Sporothrix* é a produção de melanina. A melanina presente na sua parede celular facilita o escape das células de defesa do hospedeiro, sendo capaz de inibir a expressão de antígenos durante os estágios iniciais e finais da infecção; e desempenham um papel importante na resistência aos antifúngicos (ALMEIDA-PAES *et al.*, 2016; SONG *et al.*, 2020).

### 2.2.2 Transmissão

A contaminação clássica de esporotricose ocorre a partir da inoculação cutânea ou subcutânea traumática da forma filamentosa do fungo presente em madeiras, galhos e espinhos contaminados. Por este motivo a doença era frequentemente relacionada

a profissões como jardineiros e floristas (FERREIRA, 2016; FERNANDES *et al.*, 2018). Entretanto, animais contaminados são considerados reservatórios e podem transmitir a doença aos seres humanos a partir da inoculação de formas leveduriformes do fungo por meio de mordidas, arranhões ou pelo simples contato direto com a lesão do animal (**Figura 2**) (THOMSON *et al.*, 2019).



**Figura 2:** Rotas de transmissão de esporotricose humana e animal.

Fonte: Adaptado de Rodrigues *et al.*, 2016.

As espécies *S. schenckii* e *S. globosa* são cosmopolitas e frequentemente relacionadas com a transmissão ambiental da esporotricose. Já a espécie *S. brasiliensis* está associada à transmissão zoonótica por mordidas e arranhões, causados principalmente por gatos (RODRIGUES *et al.*, 2016). Essas diferentes rotas de contágio exigem diferentes políticas públicas de saúde para o manejo e controle dessa micose (PAIVA *et al.*, 2020).

Segundo Ferreira (2016), a doença acomete diferentes animais, mas a ocorrência em gatos corresponde ao maior fator zoonótico de transmissão, uma vez que suas lesões

apresentam grande carga de leveduras. O comportamento felino é outro agravante. Geralmente, os gatos adultos com acesso à rua não se fixam no local onde residem, saindo para caçar ou acasalar, o que aumenta a chance de contato com gatos contaminados com esporotricose (MONTENEGRO *et al.*, 2014; ROSSATO, 2017). Ao retornar ao lar, esses gatos se apresentam como potenciais transmissores da infecção, tanto para outros animais quanto para humanos, desempenhando papel fundamental na manutenção da forma de contaminação zoonótica (PAIVA *et al.*, 2020).

### 2.2.3 Epidemiologia

A esporotricose é classificada como endêmica em regiões tropicais e subtropicais do globo, sendo prevalente em países como Brasil, Índia, México, Peru, Estados Unidos, China, Japão e África do Sul (ISHAM, 2021). A descrição do primeiro caso clínico de esporotricose foi feita por Benjamin Schenck, em 1898, no Hospital Johns Hopkins (Baltimore, EUA) (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017). Apesar de não ser uma doença de declaração compulsória, ao longo das décadas diversos novos casos foram relatados em todo mundo, sendo estimada uma incidência de 40 mil novos casos todos os anos, principalmente em áreas hiper endêmicas (Peru, Brasil e México) (**Figura 3**) (CHAKRABARTI, *et al.*, 2015; BONGOMIN *et al.*, 2017).

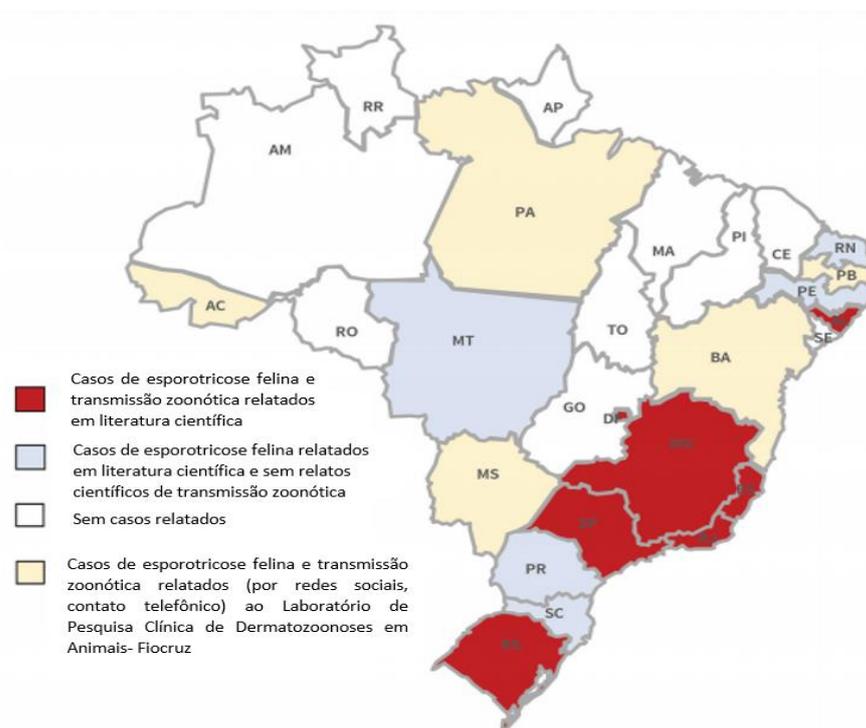


**Figura 3:** Distribuição e carga relativa de esporotricose no mundo.

Fonte: Adaptado de Chakrabarti *et al.*, 2015.

No Brasil, a região com maior número de casos de esporotricose é a região Sudeste (GREMIÃO *et al.*, 2020). Apesar de ser mais prevalente em mulheres entre 30-60 anos, é uma doença capaz de acometer indivíduos de ambos os gêneros, em qualquer faixa etária, dependendo das atividades realizadas que geram diferentes riscos de exposição ao fungo (BARROS *et al.*, 2011a; SILVA *et al.*, 2012; LECCA *et al.*, 2020).

Desde a década de 1990, tem-se observado o crescimento da transmissão zoonótica da doença no país, sendo que poucos estados ainda apresentam prevalência na transmissão clássica ocupacional (PAIVA *et al.*, 2020). Estados como Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul são consideradas zonas endêmicas ou epidêmicas de esporotricose como zoonose (**Figura 4**) (GREMIÃO *et al.*, 2017; PAIVA *et al.*, 2020).



**Figura 4:** Ocorrência de esporotricose felina e transmissão zoonótica por estados, no Brasil.

*Fonte:* Adaptado de Gremião *et al.*, 2020.

A cidade do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro) é considerada o centro da epizootia e da epidemia zoonótica de esporotricose (GREMIÃO *et al.*, 2017). O alto número de casos na cidade tem sido relacionado à interação homem-gato, sendo a transmissão por

felinos contaminados um dos principais fatores causais do aumento de incidência dos casos em humanos (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017).

Entre 1998 e 2011, a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz, Rio de Janeiro) relatou 4.188 casos de esporotricose diagnosticados em humanos (SILVA *et al.*, 2012). Posteriormente, Viana e colaboradores (2015) demonstraram que entre 1998 e 2015, 244 cães e 4703 gatos foram diagnosticados no município. Em 2016, segundo a Vigilância Sanitária do Rio de Janeiro, houve um aumento de 400% no número de casos de esporotricose felina no município, tendo sido feitos 10.283 atendimentos a mais do que no ano anterior (ROSSATO, 2017). Tais dados alarmantes fizeram com que a cidade do Rio de Janeiro fosse classificada como hiperendêmica para esporotricose associada a gatos (GREMIÃO *et al.*, 2017).

Outros estados e cidades também têm demonstrado esse perfil de esporotricose por transmissão zoonótica. A cidade de Belo Horizonte, no estado de Minas Gerais, tem sido considerada uma área epidêmica de esporotricose associada a gatos. Lecca e colaboradores (2020) conduziram um estudo entre os anos de 2016 e 2018 e identificaram 56 casos de esporotricose humana em regiões com alta prevalência de esporotricose felina (118 gatos foram diagnosticados neste intervalo de 3 anos).

Da mesma forma, na cidade de São Paulo (São Paulo), entre 2011-2013, foram diagnosticados 163 casos de esporotricose felina, sugerindo que esse surto pode afetar ainda mais a população de gatos que vivem nas ruas e, conseqüentemente, as pessoas que convivem com eles (MONTENEGRO *et al.*, 2014).

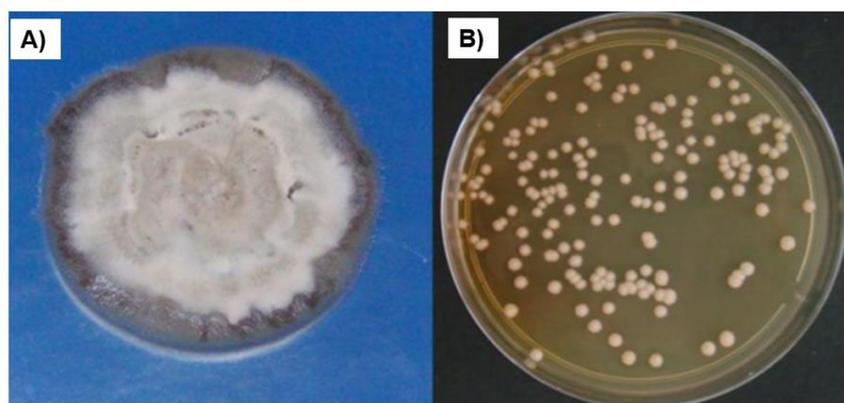
Esses dados alarmantes se devem a diversos fatores, destacando-se a ausência de um programa de controle da infecção, a dificuldade no manejo de gatos doentes e a falta de conhecimento da esporotricose pela maior parte da população (GREMIÃO *et al.*, 2020). Dessa forma, se não forem implantadas estratégias públicas de saúde quanto à prevenção e tratamento da esporotricose, as perspectivas são de aumento desses números (PAIVA *et al.*, 2020).

#### *2.2.4 Diagnóstico*

A esporotricose pode apresentar evolução benigna, dependendo da extensão das lesões e do tempo da doença, ou pode evoluir de maneira maligna e levar o paciente/animal a óbito (HUGO *et al.*, 2013). É uma doença que apresenta custo social, visto

que as lesões aparentes implicam em alterações na autoestima do paciente, afastamento das atividades de integração e sofrimento psicológico (PETER *et al.*, 2016). Para minimizar os riscos, é essencial um diagnóstico correto e rápido.

Atualmente, o padrão ouro para o diagnóstico baseia-se no isolamento do fungo por meio de raspagem da lesão ou aspiração da secreção purulenta (FERREIRA, 2016). A cultura é o método mais simples, mais seguro e mais barato para identificação do fungo. Visualmente, em cultura a 25 °C, a forma miceliana apresenta superfície enrugada e dobrada, com coloração acastanhada e enegrecida (**Figura 5A**). Quando a cultura é incubada a 37°C observa-se a forma leveduriforme do fungo, com colônias de aspecto úmido, cremoso e coloração pardacenta-amarelada (**Figura 5B**). Na avaliação microscópica de isolados de cultura são observadas hifas hialinas septadas e conídios ovais dispostos em forma de “margarida” (ZAITZ *et al.*, 1998).



**Figura 5:** Aspecto macroscópico de culturas de *Sporothrix* spp. (A) Aspecto enegrecido e de superfície enrugada de uma colônia filamentosa em ágar batata, após 21 dias de incubação a 25°C; (B) coloração pardacento-amarelada de aspecto úmido e cremoso em colônias leveduriformes incubadas a 37°C, por 10 dias, em ágar infusão de cérebro.

Fonte: Almeida-Paes, 2012.

Pelo método de Gram, as estruturas leveduriformes podem ser identificadas como gram-positivas de formas esféricas, alongadas e ovais (LACAZ, 2002). Métodos histopatológicos e sorológicos também podem ser empregados para auxiliar no diagnóstico. Entretanto, a confirmação somente é feita após o isolamento do *S. schenckii* em cultura incubada a 25 °C e sua conversão da forma filamentosa para a leveduriforme a partir do aumento da temperatura de incubação para 37 °C (HUGO *et al.*, 2013; FERREIRA, 2016).

## 2.2.5 Manifestações clínicas e tratamento

### 2.2.5.1 Esporotricose felina

A esporotricose felina é uma micose subcutânea que pode se manifestar de forma assintomática (ausência de lesões cutâneas), com lesões cutâneas únicas ou disseminadas até um quadro de infecção sistêmica, que é considerado fatal (SCHUBACH *et al.*, 2004; GREMIÃO *et al.*, 2020). No Brasil, o principal agente etiológico em gatos é o *S. brasiliensis* (NAKASU *et al.*, 2020), e a forma clínica mais comum consiste no aparecimento de lesões cutâneas disseminadas, com nódulos ulcerados (principalmente na região da cabeça) e com acometimento da mucosa nasal (Figura 6A-B) (GREMIÃO *et al.*, 2015; GREMIÃO *et al.*, 2020). Algumas lesões podem ulcerar e drenar exsudatos sanguinolentos e/ou purulentos. E, em alguns casos, é possível observar zonas de necrose, que expõem o músculo e/ou osso (Figura 6C) (GREMIÃO *et al.*, 2020).



**Figura 6:** Tipos de lesão e manifestação clínica da esporotricose felina. Esporotricose cutânea disseminada com lesões nodulares ulceradas na face e membros inferiores (A) e (B); lesão extensa no lóbulo posterior esquerdo da cabeça (atrás da orelha), com exposição da musculatura, causada por *Sporothrix* spp (C).

Fonte: Acervo pessoal, 2021.

A esporotricose acomete também o sistema respiratório superior dos gatos. Dessa forma, é comum encontrar animais com sintomas respiratórios, como espirros, dispneia e secreção nasal (GREMIÃO *et al.*, 2020). O aparecimento desses sintomas pode preceder o aparecimento de lesões cutâneas, entretanto, alguns animais podem nunca manifestá-las. O acometimento da mucosa nasal e aparecimento de sintomas gripais têm sido relacionados a reinfecções, falha no tratamento e morte do animal (GREMIÃO *et al.*, 2015; DE SOUZA *et al.*, 2018).

Apesar de apresentarem múltiplas lesões e manifestações respiratórias, os gatos acometidos pela esporotricose geralmente apresentam bom estado geral de saúde (GREMIÃO *et al.*, 2020). Assim, o prognóstico dependerá da extensão das lesões.

Gatos em tratamento com antifúngicos apresentam menor potencial de transmissão do *Sporothrix* spp., devido à diminuição da carga micótica (GREMIÃO *et al.*, 2020). Atualmente, o itraconazol (ITZ) é o fármaco preconizado para o tratamento da esporotricose felina no mundo (**Tabela 1**) (ROSSI *et al.*, 2013; NAKASU *et al.*, 2020). Entretanto, o custo e tempo do tratamento, que pode variar de 1 a 12 meses, fazem com que 30 e 40% dos tutores abandonem o tratamento dos animais (LLORET *et al.*, 2013; GREMIÃO *et al.*, 2020).

**Tabela 1:** Posologia dos fármacos comumente utilizados no Brasil para tratamento da esporotricose felina.

Fármaco	Dose preconizada
Itraconazol (Cápsula)	100 mg a cada 24h (para gatos com mais de 3 Kg); 50 mg a cada 24h (para gatos entre 1 e 3 Kg); 50 mg/ Kg a cada 24h (para gatos com menos de 1 Kg).
Itraconazol +	Dose de acordo com peso do animal +
Iodeto de Potássio (Cápsulas)	2,5 – 5 mg/Kg a cada 24h

Fonte: Adaptado de Gremião *et al.*, 2020.

Muitas vezes o tratamento pode ser associado à administração oral de cápsulas iodeto de potássio que, em associação ao ITZ, aumenta a eficácia do tratamento. Para casos em que exista infecção recorrente após uso do ITZ, a administração intralesional ou subcutânea de anfotericina B lipossomal tem sido uma alternativa (GREMIÃO *et al.*, 2020). O tratamento adequado é imprescindível para manter o controle sanitário da doença, uma vez que a elevada proliferação de gatos em ambientes urbanos acaba por formar colônias numerosas com grande potencial de transmissão e disseminação (GREMIÃO *et al.*, 2015).

### 2.2.5.2 Esporotricose humana

Em humanos, a forma cutânea da esporotricose é a prevalente, sendo caracterizada pela formação de nódulos localizados que podem ulcerar ou supurar (THOMSON *et al.*, 2019). Entretanto, a infecção pode acometer também mucosas, vísceras e sistema nervoso central, trazendo complicações ao caso clínico do paciente (OLIVEIRA, 2014).

As apresentações clínicas dependem do estado imunológico do hospedeiro, da carga inoculada e da patogenicidade do fungo (BARROS *et al.*, 2011b). Em pacientes imunossuprimidos devido à infecção pelo vírus HIV e outras comorbidades (diabetes, uso crônico de anti-inflamatórios esteroidais), a esporotricose pode evoluir para casos graves de endocardite, comprometimento da mucosa nasal e ocular, comprometimento pulmonar e osteoarticular, endoftalmite e uveíte. Entretanto, o caso mais grave é a meningoencefalite por esporotricose, que apresenta baixa resposta terapêutica e pode levar o paciente a óbito (BARROS *et al.*, 2011b; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2019).

Enquanto manifestação clínica, a esporotricose humana é classificada como: cutânea, podendo ser localizada, cutâneo-linfática e disseminada; e a extra cutânea, com acometimento sistêmico (FERREIRA, 2016). A forma clínica localizada (**Figura 7A**) constitui-se de única ou poucas lesões no local da inoculação, apresentando geralmente aspecto úlcero-crostosa com lesões eritematosas e sem acometimento do sistema linfático (BARROS *et al.*, 2010).

A forma cutâneo-linfática (**Figura 7B**) é a mais frequente, respondendo por aproximadamente 75% dos casos. Caracteriza-se pela formação de uma lesão nodular subcutânea no local da inoculação, que ocasiona a disseminação do fungo pelo sistema linfático, permitindo o surgimento de nódulos e lesões que podem ser ulceradas ao longo de todo trajeto linfático do paciente (FERREIRA, 2016; HUGO *et al.*, 2013).

A forma disseminada (**Figura 7C**) caracteriza-se pelo aparecimento de diversas lesões cutâneas em diferentes locais do corpo. Esse quadro clínico pode estar relacionado a inoculações múltiplas ou a casos de imunossupressão, como infecção por HIV, câncer e uso de imunossupressores. No caso da esporotricose invasiva, a infecção fúngica é capaz de se instalar em qualquer órgão por disseminação hemática

ou contiguidade (FERREIRA, 2016). Geralmente, este tipo acomete pacientes que apresentam comorbidades, como diabetes, alcoolismo, leucemia e doenças imunossupressoras, e gera lesões pulmonares, ósseas, no sistema nervoso central e mucosas (SCHUBACH *et al.*, 2018; VÁSQUEZ-DEL-MERCADO *et al.*, 2012). Por último, há a manifestação clínica sistêmica, que está sempre associada a uma deficiência do sistema imunológico (FERREIRA, 2016).



**Figura 7:** Lesões da esporotricose humana. (A) Lesão facial ulcerada de esporotricose cutânea localizada (Fonte: Peter *et al.*, 2016). (B) Lesões nodulares ulceradas de esporotricose cutâneo-linfática (Fonte: Mahajan, 2015). (C) Lesões de esporotricose disseminada (Fonte: Fernandes *et al.*, 2018).

Em humanos, a esporotricose pode apresentar evolução benigna, dependendo da extensão das lesões e do tempo da doença, ou pode evoluir de maneira maligna e levar o paciente a óbito, principalmente nos casos de esporotricose extra cutânea (HUGO *et al.*, 2013).

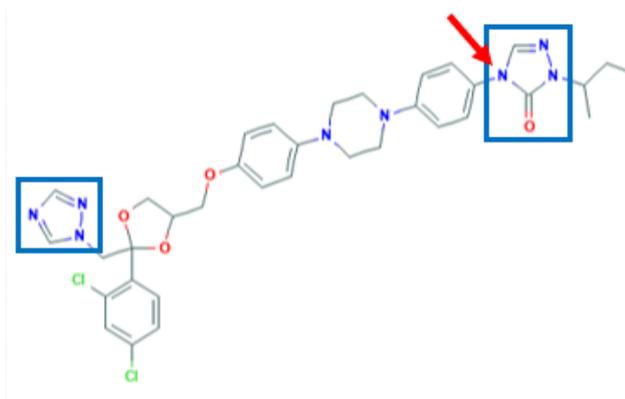
Para o tratamento da esporotricose, diferentes fármacos podem ser empregados, dependendo da evolução clínica da doença, da extensão e tipo de lesão, do acesso ao medicamento e das contraindicações (LOPES-BEZERRA *et al.*, 2006). O ITZ é o fármaco de primeira escolha para o tratamento da doença, enquanto iodeto de potássio e outros antifúngicos (terbinafina, fluconazol e anfotericina B) são opções secundárias (FICHMAN *et al.*, 2019).

No tratamento das manifestações clínicas cutâneas recomenda-se a administração oral de 200 a 500 mg de ITZ, de uma a duas vezes ao dia, durante três a doze meses (KAUFFMAN *et al.*, 2007). Entretanto, em um estudo conduzido por Barros e colaboradores (2011b) com 645 pacientes, a administração de 100 mg de ITZ por 12 meses mostrou-se eficaz e segura, com uma taxa de cura de 94,6%.

### 2.3 Itraconazol

O itraconazol (ITZ) é um derivado triazólico de primeira geração, praticamente insolúvel em água (coeficiente de partição n-octanol/ água pH 8,1 = 5,66), utilizado como antifúngico de amplo espectro, sendo considerado o fármaco de primeira escolha para o tratamento da esporotricose felina e humana (WILLEMS *et al.*, 2001; FICHMAN *et al.*, 2019; GREMIÃO *et al.*, 2020).

Na estrutura química do ITZ há anéis triazólicos que desempenham papel crucial na atividade antifúngica, bem como na toxicidade apresentada pelo fármaco (**Figura 8**) (HARDIN *et al.*, 1988).

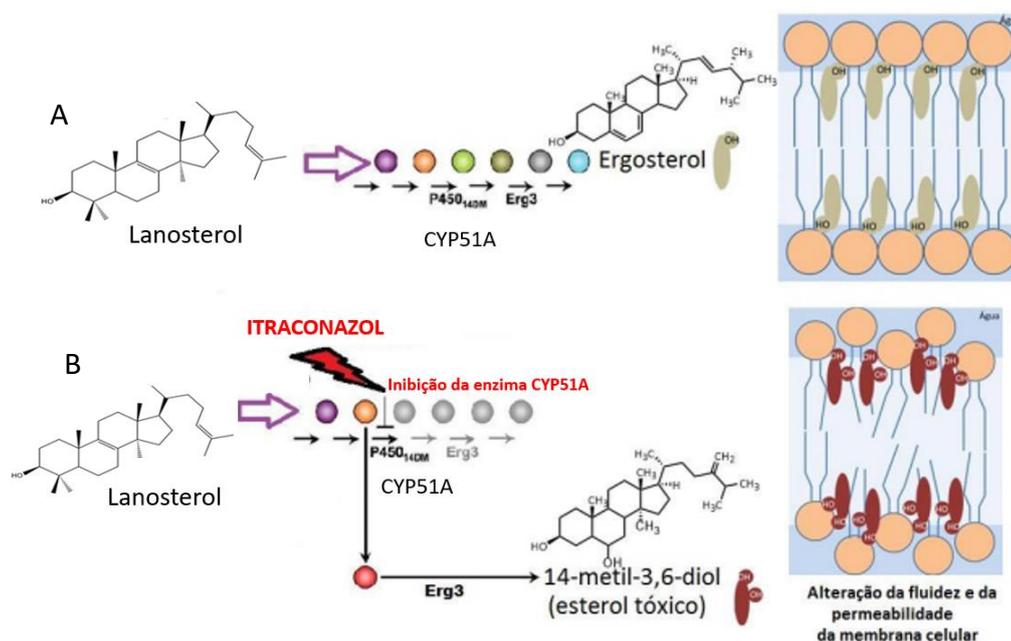


**Figura 8:** Estrutura química do itraconazol. Os anéis triazólicos estão destacados com retângulos azuis e o átomo de nitrogênio N4 com uma seta vermelha.

Fonte: Pubchem, acesso em março de 2021.

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). A interrupção dessa síntese ocorre quando o átomo de nitrogênio N4 do triazol heterocíclico (**Figura 8**) se liga ao átomo de ferro presente na enzima CYP51A dos fungos (MERCER, 1983; HITCHCOCK *et al.*, 1990). Pode ocorrer, ainda, a formação de ligações de hidrogênio entre a cadeia carbônica ligada ao anel 1,2,4-triazol-3-ona do ITZ e o aminoácido ASN-230 da CYP51A de algumas espécies de fungos, como o *S. schenckii* (MATOWANE *et al.*, 2017). Tais interações acarretam a eliminação do oxigênio necessário à reação de catalisação mediada pela enzima CYP51A, impedindo a conversão do lanosterol em ergosterol. O déficit de ergosterol leva à desorganização da membrana celular e

acúmulo de esteróis metilados na membrana, prejudicando o crescimento e a proliferação, além de causar morte celular (**Figura 9**) (SHAPIRO *et al.*, 2011; PEYTON *et al.*, 2015).



**Figura 9:** Mecanismo de ação do itraconazol na membrana celular de fungos. (A) Síntese de ergosterol a partir do lanosterol e manutenção da integridade da membrana. (B) Inibição da enzima CYP51A pelo itraconazol, com desorganização da membrana e acúmulo de esteróis tóxicos.

Fonte: Adaptado de Sueth-Santiago *et al.*, 2015.

Atualmente, o ITZ é comercializado mundialmente na forma de cápsulas, suspensão oral e injeção endovenosa (PEYTON *et al.*, 2015). Porém, no Brasil, o ITZ é comercializado apenas nas formas de cápsulas para administração oral por diferentes indústrias farmacêuticas, sendo o medicamento de referência registrado como Sporanox® (Jansen-Cilag) (ANVISA; MARTINELLO, 2007).

Apesar de ser comumente administrado pela via oral, a biodisponibilidade do ITZ é muito baixa (cerca de 55%), devido à baixa solubilidade e absorção incompleta (THAKKAR *et al.*, 2015). Adicionalmente, a administração sistêmica em doses muito altas (>400 mg/dia) pode acarretar efeitos colaterais, sendo os mais comuns: vômito, dor, náusea e distúrbios gastrointestinais (MARTIN, 1999; CROSS *et al.*, 2000). No entanto, reações adversas importantes também são relatadas na literatura, como insuficiência cardíaca congestiva (FUNG *et al.*, 2008), hipertensão, hipocalcemia

(HOFFMANN *et al.*, 2018), psoríase (CHIU *et al.*, 2018) e hepatotoxicidade severa (LOU *et al.*, 2011).

Para o tratamento de desordens fúngicas tópicas, o ITZ deve ser disponibilizado eficientemente no estrato córneo. Entretanto, a baixa biodisponibilidade oral limita esse processo (THAKKAR *et al.*, 2015). Somente 4 dias após o início do tratamento o ITZ é identificado na pele e anexos em concentrações maiores que as plasmáticas (DONCKER *et al.*, 2017). Dessa forma, para o tratamento de lesões fúngicas tópicas, o ideal seria administrar uma formulação de ITZ diretamente nas lesões. Várias pesquisas têm sido conduzidas no intuito de desenvolver nanopartículas (PASSOS *et al.*, 2020), géis (EL-SHERIDY *et al.*, 2019; NORONHA *et al.*, 2020) e cremes (KIM *et al.*, 2015) para aplicação tópica. Apesar disso, são poucos os registros de medicamentos tópicos contendo ITZ, sendo encontrados apenas na Índia, mas sob fortes críticas quanto à aprovação regulatória e ao uso indiscriminado (VERMA *et al.*, 2020).

Segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), o ITZ é um fármaco de classe II, pois apresenta baixa solubilidade e alta absorção no organismo (THAKKAR *et al.*, 2015). Com o objetivo de melhorar sua solubilidade, diversas alternativas vêm sendo pesquisadas, como a complexação com ciclodextrina (MIYAKE *et al.*, 1999; FRANCOIS *et al.*, 2005); formação de sal (TAO *et al.*, 2009); micronização (BARRETT *et al.*, 2008); produção de sistemas auto emulsionantes e soluções oleosas (HONG *et al.*, 2006; WOO *et al.*, 2008); nano e microssuspensões (PERMANA *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2020); emulsões (KIM *et al.*, 2019); microemulsões (MALI *et al.*, 2017; CHUDASAMA *et al.*, 2019); nanocarreadores, como nanoesferas (BIAN *et al.*, 2013), micelas poliméricas (LI *et al.*, 2018) e nanopartículas lipídicas (KIM *et al.*, 2010).

O estudo das propriedades físico-químicas de um fármaco é essencial durante o desenvolvimento de uma formulação, sendo a solubilidade um dos parâmetros mais importantes (ALLEN *et al.*, 2013). A solubilidade em água nos diz sobre a quantidade de fármaco que poderá dissolver e ser disponibilizada para absorção, a fim de alcançar o efeito terapêutico desejado (GIBSON, 2009; ALBUQUERQUE, 2018).

Muitos métodos são empregados com o objetivo de aumentar a solubilidade dos fármacos, sendo a cossolvência um método amplamente utilizado (SARFRAZ *et al.*, 2017). Neste método, o fármaco lipofílico é solubilizado em um solvente em que é

altamente solúvel e, posteriormente, são adicionados outros solventes, fazendo com que a polaridade de todo sistema seja reduzida e a solubilidade em meio aquoso otimizada (KEARNEY *et al.*, 2019). A mudança na polaridade do sistema acontece porque os componentes adicionados ao solvente possuem grupos doadores e aceptores de hidrogênio, além de cadeias carbônicas. Dessa forma, há maior interação do sistema com a água, por meio de ligações de hidrogênio, e diminuição da capacidade da água em repelir compostos hidrofóbicos, melhorando sua dispersão em meio aquoso (RAJ *et al.*, 2011; ALBUQUERQUE, 2018).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Desenvolver, caracterizar e avaliar a eficácia clínica de formulações carregadas com ITZ para o tratamento tópico de esporotricose felina.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Conduzir estudos de pré-formulação para selecionar excipientes grau farmacêutico que propiciem a solubilização e estabilização do ITZ;
- Desenvolver formulações tópicas carregadas com ITZ;
- Desenvolver um método analítico por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) para quantificação do ITZ nas formulações;
- Caracterizar as formulações desenvolvidas quanto aos aspectos macroscópico e microscópico (microscopia óptica de luz polarizada e microscopia eletrônica de varredura); perfil reológico e teor de ITZ;
- Avaliar a eficácia clínica das formulações desenvolvidas em felinos contaminados com esporotricose.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

O Itraconazol (ITZ) (Aktinos Pharma, Hyderabad, Índia) foi gentilmente fornecido pela Hipolabor Farmacêutica Ltda. (Belo Horizonte, Brasil). O álcool benzílico grau farmacêutico e o benzoato de benzila grau farmacêutico foram fornecidos pela MERCK KGaA (Darmstadt, Alemanha). A dimetil isorsobida (Arlasolve™), óleo de cártamo super refinado (Super Refined™ Safflower Oil), óleo de sésamo super refinado (Super Refined™ Sesame Oil), lanolina ultrapura (Medilan™ Ultra), óleo de soja (Super Refined™ Soybean Oil), óleo de girassol super refinado (Seatons Refined Sunflower Oil), isoestearato de isoesterila (Crodamol™ ISIS), óleo de oliva super refinado (Super Refined™ Olive Oil) e polietilenoglicol 400 super refinado (Super Refined™ PEG 400) foram gentilmente doados pela Croda International Plc (Sanith, Reino Unido). O óleo de rícino polioxil 35 purificado (Kolliphor® ELP), miristato de isopropila (Kollicream® IPM), álcool cetosteárico (Kolliwax® CSA50), polioxil 15-hidroxiestearato (Kolliphor® HS15), copolímero de polivinil caprolactama- acetato de polivinil polietilenoglicol (Soluplus®) e poloxamer 407 (Kolliphor® P 407) foram gentilmente doados pela Basf (Ludwigshafen, Alemanha). O éter monoetílico de dietilenoglicol (Transcutol®) foi gentilmente doado pela Gattefossé (Lyon, França) através da MCassab (São Paulo, Brasil). As vitaminas E acetato oleosas foram obtidas de dois fornecedores: RJR Nutrientes e Farmoquímicos (Osasco, Brasil), gentilmente cedido pela própria empresa; e da Biovital (São Carlos, Brasil), gentilmente cedida pelo grupo Citopharma® (Belo Horizonte, Brasil). O BHT grau farmacêutico foi cedido pela Debonne Dermocosméticos (Belo Horizonte, Brasil). O metanol grau CLAE e a acetonitrila grau CLAE foram obtidas da Fischer Chemicals (Waltham, EUA), enquanto o etanol absoluto grau analítico, o sulfato de tetrabutilamônio hidrogênio e o tampão fosfato pH 7,4 foram adquiridos da Synth (São Paulo, Brasil).

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Estudos de pré-formulação

#### 4.2.1.1 Seleção de excipientes grau farmacêutico

Inicialmente foi realizado um levantamento na literatura sobre potenciais excipientes grau farmacêutico que poderiam ser utilizados no desenvolvimento de uma formulação tópica carregada com ITZ. A pesquisa foi feita em bases científicas de dados como SciELO, Pubmed (Medline) e Google Scholar. A busca por artigos científicos nessas bases foi feita em inglês, utilizando inicialmente expressões-chaves como: *“itraconazole solvent”*, *“itraconazole for topical application”*, *“itraconazole for dermal application”* e *“topical application of insoluble drugs”*. Os artigos encontrados nessas buscas forneceram dados sobre quais excipientes eram comumente utilizados no desenvolvimento de formulações tópicas contendo ITZ e outros fármacos pouco solúveis em água. A partir dessa pesquisa foi possível aprofundar o conhecimento sobre as características de cada um dos excipientes, buscando artigos específicos nas mesmas bases científicas mencionadas anteriormente.

Também foram obtidas informações técnicas com os fabricantes dos excipientes, em livros técnicos, órgãos oficiais nacionais (ANVISA e MAPA) e internacionais (FDA), bem como em registros de patente.

Nesse estudo optou-se por utilizar a data de publicação como filtro. Dessa forma, eram selecionados artigos publicados a partir de 2017 até o ano atual, para que não fossem levantadas informações desatualizadas. Entretanto, quando algum artigo mencionava uma referência importante e relevante de datas anteriores a 2017, o filtro não era aplicado. No primeiro momento, os artigos eram analisados com base no título e no resumo, para avaliar se existia relação entre o estudo desenvolvido e as informações buscadas. Os artigos selecionados eram, então, separados para leitura e as informações sobre cada excipiente eram computadas em planilhas e/ou resumos.

#### 4.2.1.2. Avaliação da solubilidade mínima do itraconazol em diferentes excipientes

**Por motivo de confidencialidade da tecnologia, que se encontra em desenvolvimento para futuro patenteamento, a matéria sensível não será**

**revelada no presente trabalho. Ela está codificada e será referenciada por X1 a X24, que serão utilizados ao longo do trabalho como referência aos excipientes.**

Após a seleção dos excipientes (**Tabela 2**), foi realizada a avaliação da solubilidade do ITZ tendo-se como referência o teste de solubilidade mínima proposto na Farmacopeia Americana (2015) e na Farmacopeia Brasileira (2019). A avaliação foi conduzida à temperatura ambiente ( $25 \pm 5$  °C), com etapa de homogeneização de 1 minuto em banho ultrassônico Bransonic 2510R-DTH (Soni-Tech do Brasil Ltda., São Bernardo do Campo, Brasil), sendo os resultados obtidos descritos com base nos termos descritivos da **Tabela 3**. De acordo com a Farmacopeia Brasileira (2019), o termo “partes” relaciona-se ao número de mililitros de solvente por grama de sólido a ser dissolvido. Dessa forma, uma substância é considerada muito solúvel se for possível dissolver 1 g dela em menos de 1 mL do solvente.

**Tabela 2:** Excipientes selecionados para avaliação da solubilidade mínima do itraconazol.

<b>Excipientes</b>	<b>Função farmacotécnica</b>	<b>Faixa usual para aplicação tópica</b>
X1	Solvente	1 a 10% v/v <sup>1</sup>
X2	Agente solubilizante e promotor permeação cutânea	Até 10% p/p <sup>2</sup>
X3	Agente solubilizante, solvente e agente terapêutico (escabiose)	0,01 a 10% v/v <sup>3</sup>
X4	Emoliente de origem natural	Até 10% <sup>4</sup>
X5	Emoliente e promotor permeação cutânea	1 a 43% <sup>1,5</sup>
X6	Agente solubilizante e surfactante não iônico	Até 20% <sup>1</sup>
X7	Veículo hidrofóbico e emoliente	2 a 10%. Pode ser usado puro na pele <sup>1,6</sup>
X8	Veículo, agente solubilizante e promotor permeação cutânea	1 a 49,9% <sup>7</sup>
X9	Veículo oleoso e solvente	Não foi encontrada faixa usual. Pode ser usado puro na pele <sup>1,8</sup>
X10	Veículo oleoso, solvente e umectante	Não foi encontrada faixa usual. Pode ser usado puro na pele <sup>1,8</sup>
X11	Veículo e solvente oleoso	Até 30% p/p <sup>9</sup>
X12	Solvente, lubrificante e veículo hidrofílico.	Até 60% v/v <sup>10</sup>
X13	Agente solubilizante e surfactante não iônico	Até 49% p/p <sup>11</sup>

**Tabela 3.** Tabela de termos descritivos da solubilidade.

<b>Termo descritivo</b>	<b>Volume aproximado de solvente em mililitros por grama de substância</b>
Muito solúvel	Menos de 1 parte
Facilmente solúvel	De 1 a 10 partes
Solúvel	De 10 a 30 partes
Moderadamente solúvel	De 30 a 100 partes
Pouco solúvel	De 100 a 1000 partes
Muito pouco solúvel	De 1000 a 10000 partes
Praticamente insolúvel ou insolúvel	Mais de 10000 partes

\*Partes se refere ao número de mililitros de solventes por grama de sólido a ser dissolvido.

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

Ao final da avaliação da solubilidade, quando a solução se apresentava límpida, para confirmar a completa solubilização do ITZ, uma gota de cada amostra foi submetida à análise em microscópio de luz polarizada, conforme método descrito no item 4.2.6.

#### 4.2.2 Desenvolvimento das formulações

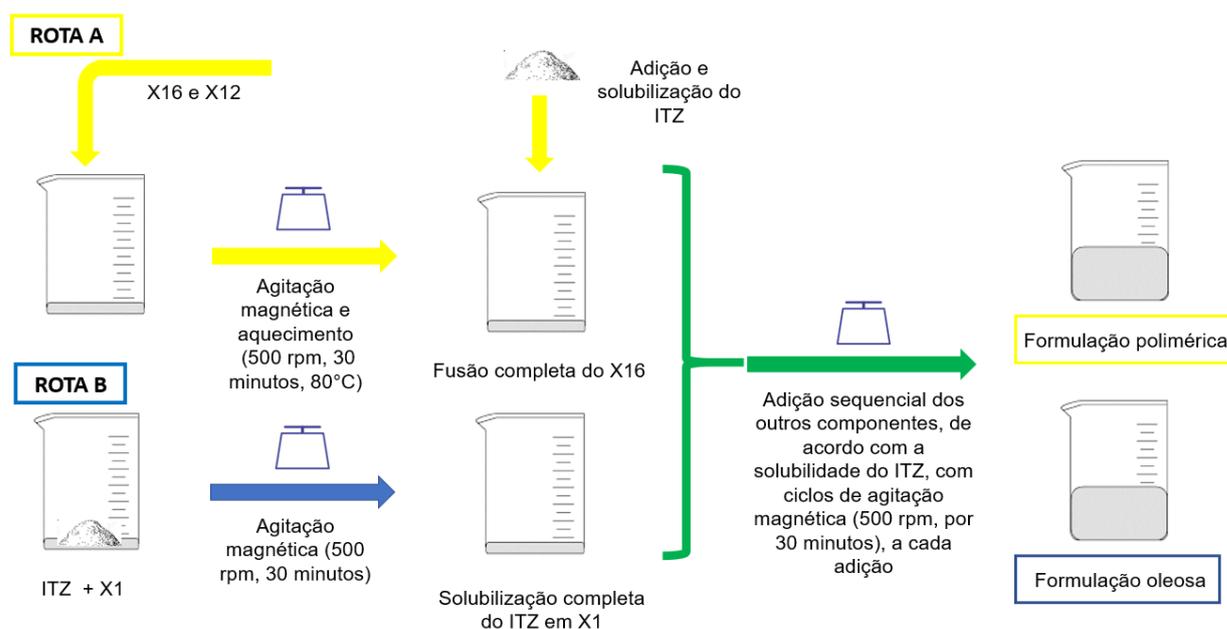
A partir dos resultados obtidos na avaliação da solubilidade, os excipientes com maior capacidade de solubilização do ITZ foram selecionados (todos grau farmacêutico e biocompatíveis). Também utilizamos informações da literatura para selecionar as concentrações seguras para administração tópica, tanto em humanos quanto em felinos. Para o ITZ utilizamos a concentração de 1% p/p, tendo como base produtos tópicos comercializados em outros países, bem como um estudo clínico de fase I conduzido por François e colaboradores (2003), em que cremes vaginais contendo entre 1 e 2% p/p de ITZ mostraram eficácia e segurança adequadas.

Com relação ao desenho da formulação e do processo, focamos na obtenção de formulações e processos facilmente transponíveis para escala industrial, sem a demanda por equipamentos específicos e de custo mais elevado. O método de preparo foi baseado na solubilidade do ITZ nos excipientes (**Figura 10**). Assim, após pesagem dos excipientes em balança analítica (Shimadzu AY220, Shimadzu do Brasil Comércio LTDA, Brasil) e solubilização completa do ITZ no X1 (Rota B) ou no X16 + X12 (Rota A), os componentes foram adicionados, sequencialmente, de acordo com a capacidade de solubilização do ITZ. A cada adição, o sistema era submetido à

agitação (500 rpm) em agitador magnético (AREC.X, Velp Científica, Brasil) por 30 minutos.

Inicialmente, propusemos a adição sequencial logo após a não identificação de precipitado na formulação. Entretanto, após observarmos melhoria visual no aspecto das suspensões do teste de solubilidade após 24h, aumentamos o tempo de agitação. Assim, a cada excipiente adicionado mantivemos a agitação por 30 minutos.

Ao longo deste trabalho foram desenvolvidas aproximadamente 100 formulações carregadas com ITZ (**ANEXO 1**), sendo possível avaliar a influência de diversos excipientes na solubilização e estabilização do ITZ, bem como nas características sensoriais, macroscópicas e microscópicas da formulação. Dessa forma, baseando-se em características como aspecto visual, ausência de microcristais, espalhabilidade e viscosidade, as formulações foram sendo selecionadas e refinadas.



**Figura 100:** Fluxograma de preparo das formulações poliméricas (Rota A) e oleosas (Rota B) carregadas com itraconazol (ITZ).

#### 4.2.2.1 Planejamento experimental de misturas

A partir dos resultados obtidos ao longo do desenvolvimento das formulações oleosas, selecionamos os excipientes mais promissores e propusemos um planejamento experimental de misturas do tipo *simplex lattice* utilizando o software *Design Expert*

13 (Stat-Ease®, Minneapolis, EUA). Os fatores avaliados foram as concentrações de X1 e X10, sendo codificados em diferentes níveis (**Tabela 4**, S114-S121, **ANEXO 1**).

**Tabela 4** - Planejamento experimental de misturas do tipo *simplex lattice* para dois componentes.

Formulação	X1 (%p/p)	X10 (%p/p)
S114	1 (15%)	0 (5%)
S115	0 (5%)	1 (15%)
S116	0,5 (10%)	0,5 (10%)
S117	0,5 (10%)	0,5 (10%)
S118	0,833 (12,5%)	0,167 (7,5%)
S119	1 (15%)	0 (5%)
S120	0 (5%)	1 (15%)
S121	0,167 (7,5%)	0,833 (12,5%)

Todos os demais componentes da formulação tiveram suas concentrações fixadas a partir da análise dos melhores resultados obtidos ao longo deste estudo. Os fatores respostas analisados foram: ITZ solubilizado na formulação (%), espalhabilidade (cm) e viscosidade após 24h de produção.

#### 4.2.3 Construção da curva dose resposta do ITZ

Para a determinação do teor de ITZ nas formulações desenvolvidas foi desenvolvido um método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A separação cromatográfica foi realizada em um sistema de cromatografia Shimadzu® Prominence, equipado com desgaseificador DGU-20A5, unidade de bombeamento de solvente LC-20AT, auto injetor SIL-20AC com *loop* de 100 µL, controlador de sistema CBM-20A e detector DAD SPD-20A (Shimadzu Corporation, Quioto, Japão). O *software* utilizado para coletar e processar os dados cromatográficos foi o *LC solution* versão 1.21. Foi utilizada uma coluna (C18) de fase-reversa de 150 mm x 4 mm e partículas de 5 µm (Innoval, Agela Technologies, Tianjin, China). A detecção foi realizada em comprimento de onda de 262 nm, com taxa de fluxo de 0,7 mL/min e injeção de 10 µL. A fase móvel (FM) utilizada foi composta por acetonitrila (ACN) grau CLAE (Biograde, Durham, EUA) e água ultrapura (60:40). O método analítico utilizado baseou-se em Matsuura e colaboradores (2019) com modificações.

##### 4.2.3.1 Avaliação da seletividade

A seletividade do método foi demonstrada pela separação do ITZ de todos os potenciais compostos interferentes, com resolução adequada. A pureza do pico de interesse foi avaliada por meio de detector de arranjo de diodos (DAD) na região do ultravioleta, para comprovar que o pico foi atribuído somente ao ITZ. Todas as amostras foram preparadas empregando uma solução de metanol acidificado (HCl 0,4% p/p) como solvente inicial e diluídas na FM posteriormente.

#### 4.2.3.2 Linearidade

Para determinação da linearidade foram utilizados seis níveis de concentração, em triplicata. O intervalo linear avaliado foi de 0,5 a 8 µg/mL. Alíquotas de ITZ foram diluídas em fase móvel, de modo a obter concentrações de 0,5, 2, 3, 4, 5 e 8 µg/mL. As áreas dos picos detectados foram utilizadas para a construção da curva analítica. Após a avaliação da normalidade dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk e homocedasticidade pelo teste de Cochran, a regressão linear foi verificada pelo método de mínimos quadrados ordinários utilizando o programa computacional GraphPad Prism 8.2 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). Buscando cumprir as premissas do Guia para tratamento estatístico da validação analítica (ANVISA, 2017), foi verificado se o coeficiente angular era estatisticamente diferente de zero e se o linear não estatisticamente diferente de zero, bem como os coeficientes correlação e determinação. O nível de significância considerado foi de 5%.

#### 4.2.3.3 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados calculados a partir do desvio padrão do intercepto das 3 curvas de calibração, utilizando as fórmulas abaixo, conforme recomendado pela RDC 166/2017 (BRASIL, 2017).

$$LD = \frac{3,3 \cdot \sigma}{IC} \qquad LQ = \frac{10 \cdot \sigma}{IC}$$

#### 4.2.4 Cálculo de teor do ITZ nas formulações

O teor de ITZ nas formulações foi avaliado utilizando o método descrito no Tópico 4.2.3. O método de extração do ITZ das formulações foi baseado em Chudasama e colaboradores (2011). Inicialmente, para avaliar a quantidade de ITZ solubilizado no sistema, as formulações foram preparadas em duas condições distintas: após 1 minuto sob agitação em vórtex modelo Wizard (Velp Scientifica, Usmate Velate, Itália);

e após 5 minutos de centrifugação em mini centrífuga Kasvi (São José dos Pinhais, Brasil). Utilizando uma balança analítica (Shimadzu AY220, Brasil), foi pesada quantidade suficiente de formulação equivalente a 20 mg de ITZ. Para as formulações poliméricas a extração do ITZ foi feita adicionando uma solução de metanol acidificado (HCl 0,4% p/p) em balão volumétrico e agitação manual. Diluições sequenciais em solução de ACN: água ultrapura (60:40) foram realizadas a fim de se obter uma concentração final de 4 µg/mL de ITZ. Para as formulações oleosas o metanol acidificado foi substituído pelo tetraidrofurano (THF) (Êxodo Científica, Brasil) para extrair o ITZ. Na sequência, foram realizadas diluições propostas em solução de ACN: água ultrapura (90:10) para obter a concentração final de 4 µg/mL.

#### *4.2.5 Microscopia eletrônica de varredura*

A presença de cristais e organização polimérica da formulação S108, após 30 dias de produção, foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para o preparo da amostra, uma gota da formulação foi colocada sobre uma fita de carbono isolada do meio externo por 48h para secagem. Posteriormente, a amostra foi metalizada com íons ouro/ paládio por 90s. A amostra foi analisada em microscópio eletrônico de varredura FEG Quanta 200 Fei, no Centro de Microscopia da UFMG, com voltagem de 10,0 kV.

#### *4.2.6 Microscopia óptica de luz polarizada*

A avaliação da presença de cristais de ITZ nas formulações foi realizada através da microscopia óptica de luz polarizada, utilizando um microscópio óptico com polarização da luz (Zeiss Axio Imager M2, Carl Zeiss Microscopy S.L., Alemanha) equipado com câmera digital Axio Cam Model ERc 5S (Carl Zeiss Microscopy S.L., Alemanha). Uma gota das amostras foi adicionada, sem diluição prévia, diretamente sobre uma lâmina de vidro, sendo cobertas com lamínula e avaliadas utilizando-se software ZEN Lite 2012 (Carl Zeiss Microscopy S.L., Alemanha) sob aumento de 200x.

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

avaliadas após a produção, 24h e 48h. Caso não apresentassem cristais no decorrer desses dias, eram acompanhadas em intervalos de 7 dias quanto ao aparecimento de cristais. Porém, nem todas as avaliações foram conduzidas devido às restrições de utilização do laboratório durante a pandemia do COVID-19.

#### *4.2.7 Avaliação macroscópica e organoléptica*

Todas as formulações foram avaliadas macroscopicamente e fotografadas após a produção. Na avaliação macroscópica foram observados cor, aspecto, odor e sensação ao tato. A análise visual foi realizada diariamente sob luz natural, em fundo preto, sendo observado presença de precipitado, turvação ou separação de fases. Se identificada alguma modificação, a formulação era fotografada e buscava-se a identificação da causa raiz. Na sequência, novas propostas eram realizadas com base em um racional teórico para melhorar o produto.

#### *4.2.8 Avaliação da viscosidade*

A avaliação da viscosidade foi conduzida em viscosímetro rotacional Brookfield, modelo DV III (Ametek Brookfield, Middleborough, EUA). 0,5 mL de amostra das formulações foram colocadas no copo de amostragem e a leitura foi obtida utilizando *spindle* CP52. Os dados de viscosidade (cP) e tensão de cisalhamento (D/cm<sup>2</sup>) foram coletados em intervalos de 0,375 a 7,5 sec<sup>-1</sup> para a formulação polimérica e em taxa de cisalhamento fixa igual a 1125 sec<sup>-1</sup> para as formulações oleosas. Todas as análises foram conduzidas em temperatura ambiente.

#### *4.2.9 Avaliação da espalhabilidade*

A espalhabilidade das formulações foi avaliada utilizando o método descrito por Pereira e colaboradores (2020) com modificações. À temperatura ambiente 0,1 g da amostra foi pesada e colocada centralizada entre duas placas de vidro de tamanho 20 x 20 cm, sobre um papel milimetrado. Um peso padrão de 200 g (Classe E2, KN Waagen, São José dos Campos, Brasil) foi então colocado sobre as placas de vidro. Após 1 minuto, o diâmetro da área espalhada foi medido (cm).

#### *4.2.10 Avaliação clínica da eficácia em felinos infectados com esporotricose*

A avaliação clínica da eficácia das formulações desenvolvida em felinos infectados com esporotricose foi realizada em parceria com a Escola de Veterinária da UFMG

(EV-UFMG), após aprovação dos protocolos pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA 24/2020) (**ANEXO 2**).

#### 4.2.10.1 Caso piloto

Inicialmente foi conduzido um estudo piloto em um gato macho aparentando 7 anos resgatado no *campus* Pampulha da UFMG (Belo Horizonte- MG). O felino apresentava lesão extensa na cabeça, próximo à orelha esquerda (**Figura 11A**) e foi encaminhado a uma clínica veterinária. Por meio de exames de citologia, aplicando a técnica de *imprinting* de lâmina com esfregaço do material coletado diretamente da lesão, confirmou-se o diagnóstico de esporotricose.

Inicialmente, o animal foi tratado com amoxicilina oral (250 mg/5 mL, 2x/dia, 12 dias) associada a cápsulas de ITZ (100 mg, 1x/dia, 2 meses). A cicatrização da lesão foi lenta (**Figura 11B**) e, após 2 meses, foi associada administração oral de iodeto de potássio (KI) (5 mg), o que aumentou a velocidade de cura (**Figura 11C**). Entretanto, após um mês do tratamento com KI, o animal parou de se alimentar e apresentou exames laboratoriais de marcadores hepáticos alterados. Dessa forma, o tratamento (ITZ + KI) foi interrompido e deu-se início à administração de suplementos vitamínicos e minerais junto à terapia com amoxicilina e clavulanato de potássio. A lesão piorou consideravelmente após três semanas (**Figura 11D**). Assim que o animal apresentou melhora clínica, foi retomada a administração de ITZ oral (100 mg, 1x/dia) associado à aplicação da formulação tópica de ITZ (1% p/p), S86, desenvolvida no presente trabalho.



**Figura 11:** Caso clínico de gato macho com esporotricose resgatado no *campus* Pampulha da UFMG. Observa-se em A) animal se alimentando, antes do resgate, com lesão na cabeça, próximo à orelha esquerda; B) cicatrização lenta da lesão mediante tratamento com ITZ oral associado ao antibiótico

amoxicilina; C) cicatrização mais rápida da lesão após associação com iodeto de potássio; D) piora do quadro clínico do animal após suspensão do tratamento, em decorrência de alterações hepáticas.

*Fonte: Acervo pessoal/ Lincoln. 2020.*

#### 4.2.10.2 Estudo clínico em felinos

A partir do resultado promissor no caso piloto, foi iniciado um estudo de intervenção do tipo ensaio comunitário controlado, realizado entre dezembro de 2020 e maio de 2021, em municípios da região metropolitana de Belo Horizonte. O estudo abrangeu casos de esporotricose felina em gatos domésticos e não ferais, cujos tutores aceitaram participar do estudo. Após o contato com o tutor do animal, era agendado um atendimento clínico veterinário. Nesse atendimento, o tutor recebia e assinava o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) (**ANEXO 3**), era feita a avaliação do estado de saúde geral do animal e o registro em fichas clínicas (**ANEXO 4**).

A coleta de material purulento das lesões suspeitas de esporotricose foi feita pelos veterinários treinados, utilizando *swab* estéril, e encaminhada para análise e diagnóstico no Laboratório de Micologia e Micotoxinas (LAMICO) da EV-UFMG. Caso o resultado fosse positivo para esporotricose, dava-se início ao tratamento do animal.

Inicialmente, 80 gatos foram incluídos no estudo. Desses, 61 receberam apenas a administração oral diária de uma cápsula de ITZ (100 mg) e 19, que apresentavam lesões únicas, tiveram o tratamento tópico da lesão com a formulação S108 associado ao tratamento oral. A administração da formulação tópica era feita com aplicação de uma gota diretamente na lesão, uma vez ao dia. Os animais foram acompanhados quinzenalmente e o estado das lesões avaliado e registrado através de fotografias. Quando observada a cicatrização da lesão e aparecimento de pelos, a administração dos medicamentos era mantida por mais 30 dias. Todas as variáveis coletadas durante o estudo (**Figura 12**) foram organizadas em uma planilha. Para a análise descritiva foram elaborados gráficos e tabelas com a distribuição das frequências das variáveis. As associações entre “Tipo de tratamento” e “Óbito”, e entre “Tipo de tratamento” e “Cura”, foram avaliadas pelo Teste Exato de Fisher. Por não apresentar distribuição normal, a diferença entre “Tempos de tratamento” e “Tipo de tratamento” foi avaliada pelo teste de Mann-Whitney. O nível de significância considerado foi de

5%. As análises foram realizadas com o *software* R, pacote *stats* versão 0.3.0 (R Core Team, 2020).

Nome da Variável	Natureza	Categorias de resposta
Tipo de tratamento	Dicotômica	0= Itraconazol oral apenas; 1= Itraconazol oral + tópico
Cura	Dicotômica	0 = Não; 1 = Sim
Óbito	Dicotômica	0 = Não; 1 = Sim
Tempo de tratamento	Quantitativa	Número de dias

**Figura 12:** Quadro resumo com as variáveis analisadas no estudo clínico e suas respectivas categorias de respostas.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

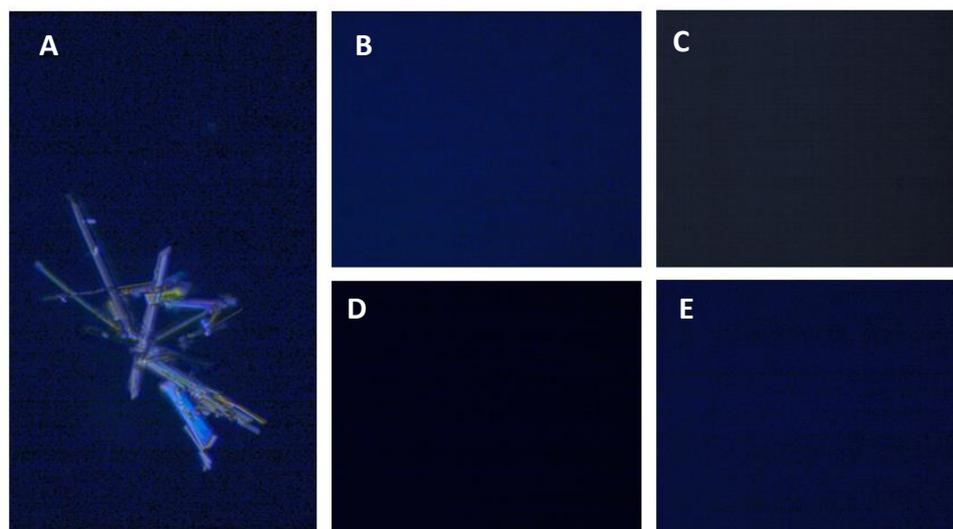
### 5.1 Avaliação da solubilidade mínima do itraconazol em diferentes excipientes

Os resultados obtidos na avaliação da solubilidade do ITZ nos excipientes selecionados (**Tabela 2**) estão ilustrados na **Tabela 5**. Como pode ser observado, na maioria dos excipientes o ITZ foi considerado praticamente insolúvel ou insolúvel. Entretanto, no X1, X2, X3 e X8, o ITZ foi, respectivamente, facilmente solúvel, moderadamente solúvel, pouco solúvel e muito pouco solúvel. Enquanto para X1 foi necessário apenas 100 µL para solubilizar 10 mg de ITZ, para X11, por exemplo, 20 mL não foram suficientes para solubilizar o ITZ.

Para confirmar se o ITZ realmente havia sido solubilizado, as amostras de X1, X2, X8 e X3 foram analisadas em microscópio de luz polarizada e as imagens obtidas encontram-se ilustradas na **Figura 13**. A morfologia dos cristais de ITZ em suspensão foi utilizada como referência a partir da análise de uma suspensão aquosa de ITZ (**Figura 13A**). Como pode ser observado nas **Figuras 13B-E**, não foi possível observar a presença de cristais de ITZ nas soluções de X1, X2, X8 e X3, fornecendo uma evidência de que o fármaco se encontrava totalmente solubilizado nesses excipientes nos volumes especificados na **Tabela 5**.

**Tabela 5:** Solubilidade mínima do itraconazol em diferentes excipientes grau farmacêutico.

Excipientes	Volumes de excipientes utilizados e solubilidade do itraconazol						Termo descritivo
	10 uL	90 uL	200 uL	700 uL	9 mL	10 mL	
X1	Não	Sim	-	-	-	-	Facilmente solúvel
X2	Não	Não	Não	Sim	-	-	Moderadamente solúvel
X3	Não	Não	Não	Não	Sim	-	Pouco solúvel
X4	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Praticamente insolúvel ou insolúvel
X5	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Praticamente insolúvel ou insolúvel
X6	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Praticamente insolúvel ou insolúvel
X7	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Praticamente insolúvel ou insolúvel
X8	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Muito pouco solúvel
X9	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Praticamente insolúvel ou insolúvel
X10	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Praticamente insolúvel ou insolúvel
X11	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Praticamente insolúvel ou insolúvel
X12	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Praticamente insolúvel ou insolúvel
X13	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Praticamente insolúvel ou insolúvel



**Figura 1311:** Microscopia de luz polarizada (aumento de 200x) ilustrando a morfologia dos cristais de itraconazol em água (A) e ausência desses cristais nas soluções de X1 (B), X3 (C), em X2 (D) e X8 (E).

A alta solubilidade do ITZ no X1 pode ser explicada pelas características do solvente. Estudos já publicados mostraram que o ITZ é capaz de formar uma mistura eutética com o fenol, devido à ligação de hidrogênio entre a hidroxila do fenol e a carbonila do ITZ. Tal justificativa pode ser estendida para explicar a interação entre a hidroxila fenilalquílica do X1 e o ITZ, que no nosso estudo apresentou uma solubilidade de, aproximadamente, 100 mg/mL a 25 °C.

Com relação ao X3, apesar de ser um derivado do X1, sua capacidade de solubilizar o ITZ foi 100 vezes menor, aproximadamente 1 mg/mL. A solubilidade do ITZ neste excipiente pode ser devido à interação dipolo-dipolo entre o grupo éster da sua estrutura e o carbonila da molécula de ITZ. Porém, possivelmente devido ao impedimento estérico decorrente das cadeias carbônicas, as interações moleculares foram menores.

Já a X2 resultou em uma solubilidade de aproximadamente 10 mg/mL. Não foram encontrados estudos na literatura que relacionassem seu uso associado ao ITZ. Entretanto, a constante dielétrica, que mede o momento dipolar das moléculas e a capacidade do solvente cancelar parcialmente a intensidade de campo elétrico do soluto nele disperso (GREMIÃO & CASTRO, 1999; FAKHREE *et al.*, 2010), pode constituir uma das hipóteses para a solubilidade observada. De maneira geral, quanto menor a constante dielétrica de um solvente, menor sua polaridade. X2 apresenta baixa constante dielétrica e, por isso, é capaz de solubilizar moléculas pouco solúveis,

como prednisona e dexametasona. Nesse estudo, por meio de espectroscopia de infravermelho, também foi mostrado que a X2 interagia com o metanol por interações intermoleculares do tipo ligação de hidrogênio. Assim, ao avaliarmos a estrutura química desse solvente é possível especular a ocorrência de interações do tipo ligação de hidrogênio que, associado à baixa constante dielétrica, podem justificar a solubilidade observada para o ITZ.

Também não foi encontrada na literatura uma descrição dos possíveis mecanismos de interações químicas que justifiquem a solubilidade do ITZ no X8 (0,5 mg/mL). Mas, alguns estudos demonstram que o X8 também foi identificado como um bom solvente para o ITZ.

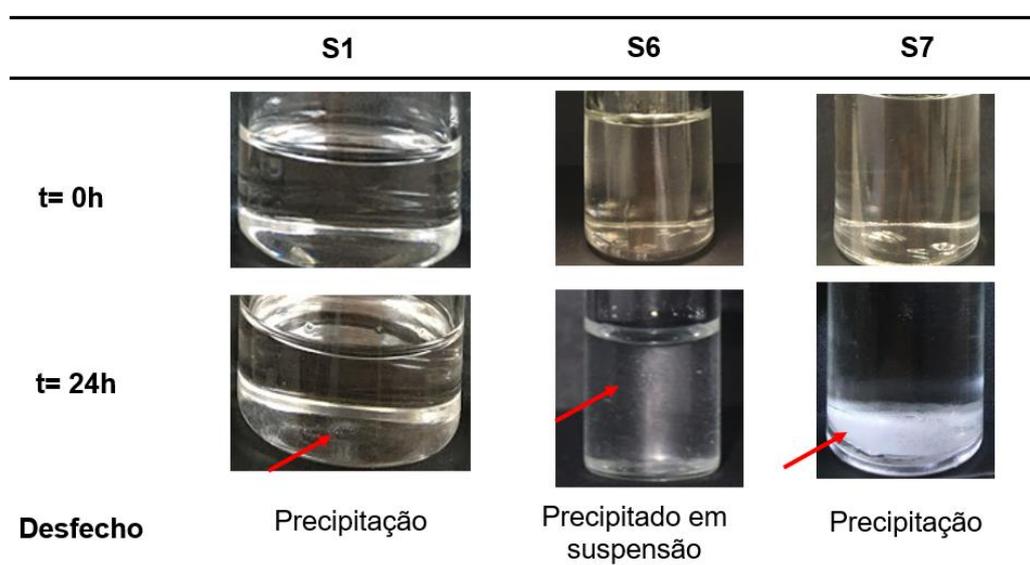
## **5.2 Avaliação do impacto dos excipientes na solubilização do itraconazol nas formulações desenvolvidas**

### *5.2.1 Óleos vegetais*

Inicialmente, o desenho proposto para a formulação foi uma solução fluida e oleosa, mimetizando os medicamentos do tipo *pour-on*, que são muito utilizados na medicina veterinária. Assim, diferentes óleos vegetais foram avaliados em concentrações de aproximadamente 20% p/p (S1 a S7, **ANEXO 1**).

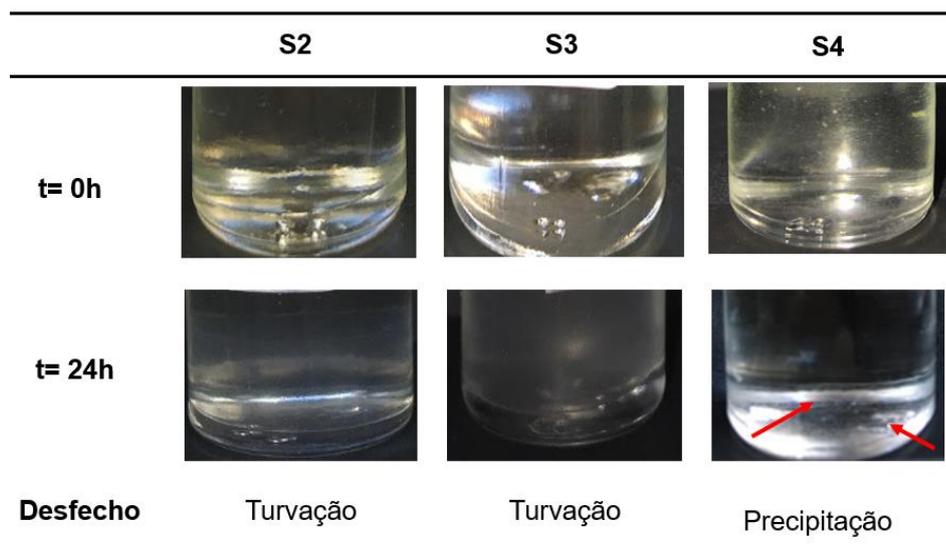
O primeiro óleo vegetal avaliado foi o X14, devido à propriedade de mitigar a formação de isômeros e à interferência na produção de melanina. Como esse óleo é utilizado em formulações tópicas a 3% (ROWE *et al.*, 2009), optamos por utilizá-lo a 2%p/p (S1-S65, **ANEXO 1**). O X9 também foi avaliado desde o início, nas concentrações de 20%, 12%, 17% e 18% p/p (S1, S6 e S7, **ANEXO 1**). A utilização deste excipiente está associada ao controle da dor e da inflamação (NASIRI & FARSI, 2017; LIN *et al.*, 2018) e à solubilização de 26,1 µg/mL do ITZ. No entanto, em todas as formulações desenvolvidas foi observado ITZ precipitado dentro de 24h (**Figura 14**). Na formulação S1 não observamos aumento de ITZ precipitado ao longo do tempo, mas a formulação amarelou, tornando-se alaranjada, o que pode ser um indício de degradação do fármaco e/ou excipientes. Nas formulações S6 e S7 foi observado um aumento no volume de precipitado ao longo dos dias, formando uma camada espessa e de difícil ressuspensão no fundo do frasco.

Na sequência avaliamos o X23 que, além de ter um custo menor, apresenta propriedades anti-inflamatórias, antioxidante e de reparação cutânea (LIN *et al.*, 2017), bem como relato de solubilização de 22,3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  do ITZ. O X23 foi avaliado na concentração de 17% p/p (S2 e S3, **ANEXO 1**). No entanto, após 24h foi observada turvação do sistema (**Figura 15**), que aumentou ao longo do tempo. Adicionalmente, as características sensoriais não foram favoráveis, apresentando textura oleosa, pegajosa e com odor residual de óleo de cozinha.



**Figura 14:** Aspecto macroscópico das formulações S1, S6 e S7 após a produção (0h) e após 24h. As setas vermelhas destacam a presença de precipitado.

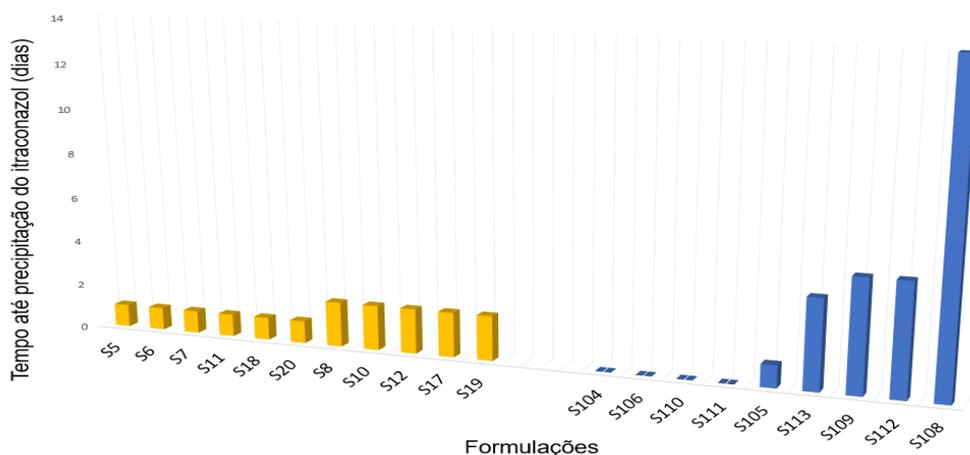
Em seguida avaliamos o X15 (7% p/p) em associação ao X9 (5%) (S4, **ANEXO 1**), devido às propriedades cicatrizantes e capacidade de reparação do tecido cutâneo (LIN *et al.*, 2017). Novamente observamos precipitação do ITZ após 24h (**Figura 15**), que aumentou ao longo do tempo, e apresentou sensorial desfavorável (textura oleosa e pegajosa, odor residual inadequado).



**Figura 15:** Aspecto macroscópico das formulações S2, S3 e S4 após a produção (0h) e após 24h. As setas vermelhas destacam a precipitação do ITZ no fundo do frasco.

Assim, apesar do ITZ apresentar um log de P igual a 5,66, observamos que sua solubilização e estabilização em óleos vegetais não é fácil. Observação semelhante foi feita em outros estudos que sugeriram que, apesar do elevado log de P, o ITZ é melhor classificado como um fármaco hidrofóbico do que lipofílico. Diante dessas observações, optamos por reduzir a concentração dos óleos vegetais, mantendo o X9, por ter apresentado melhores resultados (S5-S8, S10-12, S17-S20, **ANEXO 1**). Avaliando a **Figura 16** podemos observar que, de maneira geral, a substituição de parte do óleo vegetal por outros excipientes foi benéfica. Nas formulações S8, S10, S12, S17 e S19 com, respectivamente, 10%, 1%, 1%, 4% e 8% e X9, houve maior estabilização do ITZ. Entretanto não observamos uma relação linear, mostrando a influência dos demais excipientes na estabilização do ITZ em solução.

Na sequência avaliamos o X10 nas concentrações de 3% (S33-S62), 2% (S66) e 1% p/p (S67-S72) (**ANEXO 1**). O uso desse óleo associado ao ITZ também é relatado na literatura e, em testes de solubilidade (37°C) foi demonstrada a capacidade de solubilizar cerca de 54 mg/mL do fármaco. A inserção do X10 propiciou uma melhora na manutenção do ITZ no sistema (**Tabela 6**).

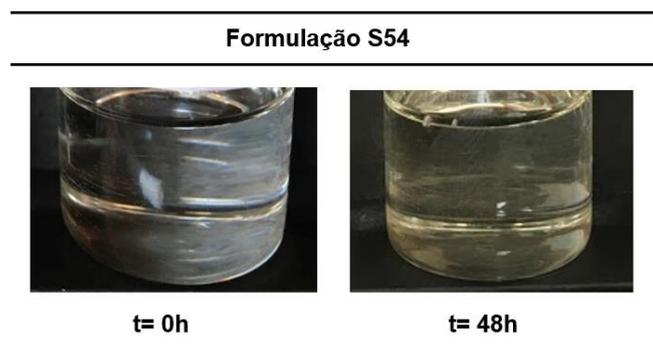


**Figura 16:** Influência do X9 em diferentes concentrações (colunas laranjas) *versus* a retirada dos óleos vegetais no tempo até o aparecimento de precipitado de itraconazol.

Na formulação S54 (3% X10) somente observamos precipitado após 15 dias. Mas essa formulação amarelou em menos de 2 dias (**Figura 17**), o que pode ser indício de auto oxidação dos compostos fenólicos do X10. No entanto, também observamos amarelamento em outras formulações e a monografia do ITZ na Farmacopeia Norte-Americana (USP42- NF37, 2019), bem como a bula do medicamento de referência Sporanox® (Janssen-Cilag, Bélgica), relatam que o ITZ é branco a amarelado. Adicionalmente, a bula da solução oral do Sporanox® (10mg/mL), descreve a solução como límpida e amarelada.

**Tabela 6:** Relação entre a formulação e a quantidade de dias até o aparecimento de ITZ precipitado.

Formulação	Tempo até precipitação do itraconazol
S54	15 dias
S66	11 dias
S67	4 dias



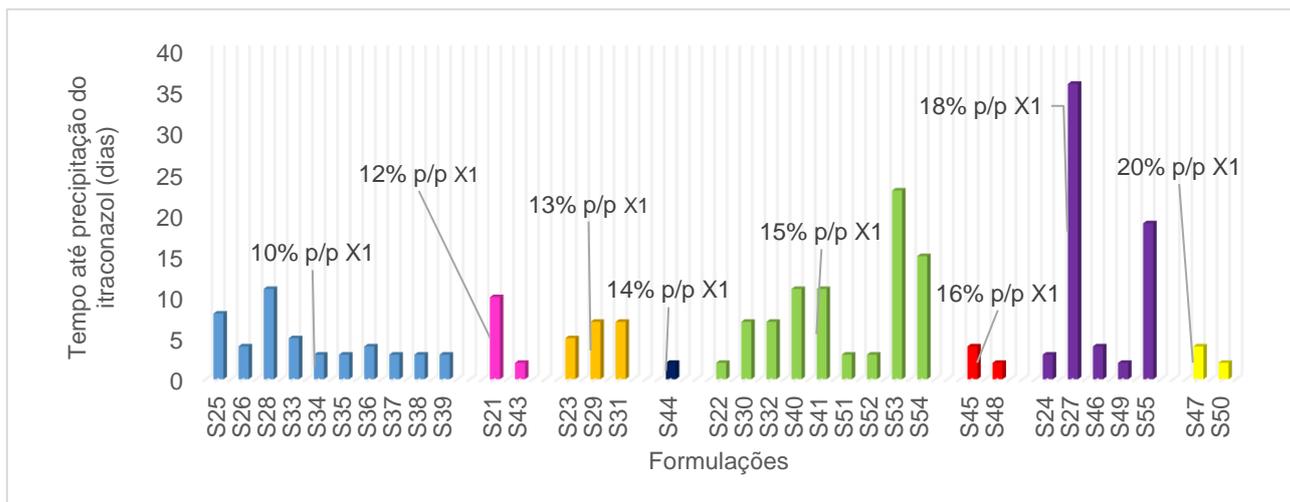
**Figura 17:** Aspecto macroscópico da formulação S54. Observa-se o amarelamento entre o dia de produção (0h) e dois dias depois (48h).

Após a avaliação dos resultados obtidos com os óleos vegetais, propusemos que sua carga no sistema fosse reduzida para concentrações mais baixas, no máximo 6% p/p, e mantivemos o X9 e o X14 na maioria das formulações desenvolvidas, devido às propriedades acima relatadas.

### 5.2.2 X1

Ao longo do estudo foi possível observar a dificuldade de solubilização do ITZ em componentes oleosos e de sua estabilização no sistema. Frente a essa dificuldade, optamos por aumentar a concentração do seu principal solvente: o X1. Nas primeiras formulações avaliamos as concentrações de 3 e 6% (S1 a S6), mas nas formulações subsequentes aumentamos para 10% (S7 a S20) (**ANEXO 1**). No entanto, formação de precipitado após 24h ou 48h continuou sendo observada.

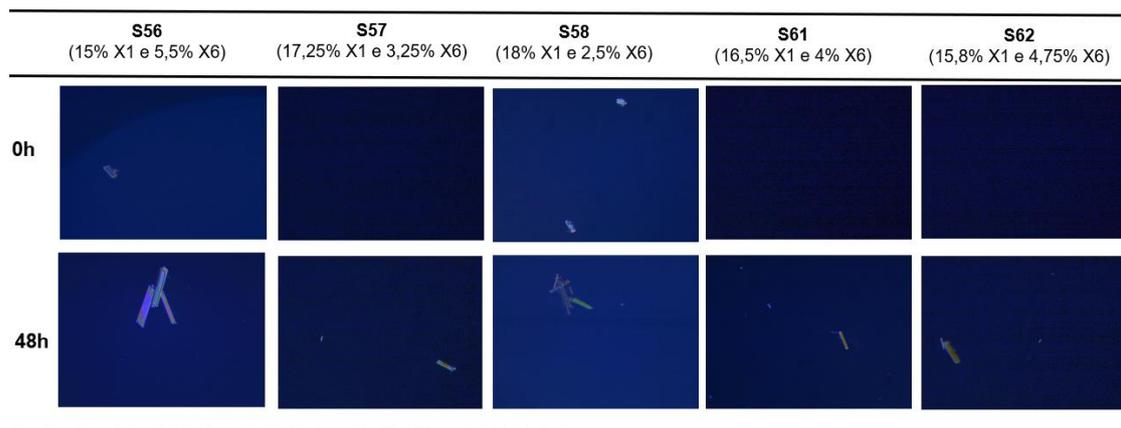
Desta forma, além da concentração de 10% (p/p), também avaliamos concentrações (p/p) maiores: 10% (S25-26, S28, S33-39 e S42), 12% (S21 e S43), 13% (S23, S29, S31), 14% (S44), 15% (S22, S30, S32, S40-41 e S51-54), 16% (S45 e S48), 18% (S24, S27, S46, S49 e S55) e 20% (S47 e S50) (**ANEXO 1**). Como pode ser observado na **Figura 18**, as melhores formulações em termos de estabilidade e manutenção do ITZ em solução foram obtidas com concentrações de 15 a 18% p/p de X1. Entretanto, ao longo dos meses foi observada deposição de mais precipitado de ITZ e amarelamento em todas as formulações, à exceção da S27, que se manteve sem precipitado por 36 dias, mas que ao longo dos meses apresentou intensa precipitação de ITZ.



**Figura 18:** Influência da concentração do X1 na estabilização do itraconazol em solução.

Portanto, uma possível explicação para o aumento do X1 não ter estabilizado o ITZ pode ser sua interação com grupos por fixar a concentração do X1 em 15% p/p.

Para melhor entender a interação entre os diferentes excipientes, conduzimos um experimento de mistura, onde avaliamos o aumento da concentração do X1 (15-18%p/p) frente à variação na concentração do surfactante X6 (2,5-5,5% p/p) (S56-S58 e S61-S62, **ANEXO 1**). Entretanto, as mesmas dificuldades foram novamente observadas. Após dois dias, todas as formulações apresentavam cristais de ITZ (**Figura 19**), que aumentaram em quantidade e em tamanho.



**Figura 19:** Aspecto microscópico das formulações S56-S58 S61-S62, logo após seu preparo e após 24h.

Assim, apesar do X1 ser um excelente solvente para o ITZ, nas concentrações e associações avaliadas não foi possível estabilizar o fármaco em solução. Na literatura já foi relatada a presença de ITZ na camada intermediária de uma microemulsão,

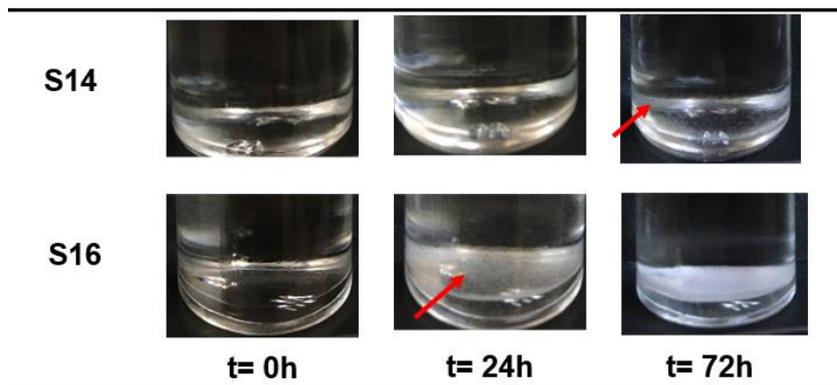
interagindo com os surfactantes. No mesmo estudo, o X1 também foi utilizado como solvente e sua migração para a fase aquosa desestruturava a microemulsão e provocava a precipitação do ITZ.

### 5.2.3 X3

Devido à capacidade de solubilizar o ITZ, o X3 foi um dos principais excipientes utilizados no desenvolvimento da formulação. Além da ação cossolvente, sua inserção também foi proposta devido à capacidade de esquentar um pouco a região onde é aplicado topicamente (ROWE *et al.*, 2009), o que pode ser uma vantagem, uma vez que fungos do gênero *Sporothrix* são termossensíveis (SIQUEIRA, 2017).

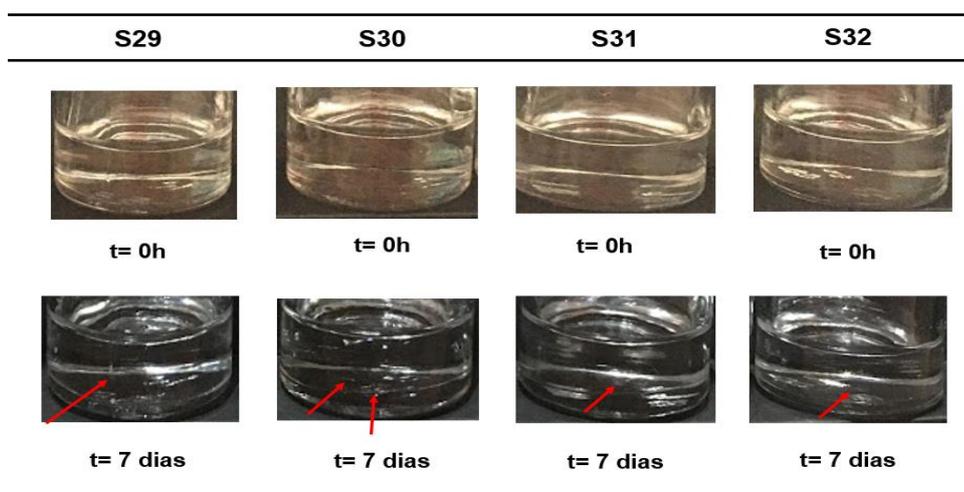
Logo no início avaliamos o impacto da presença ou não do X3 na formulação. Quando comparamos as formulações S5 e S6 (**ANEXO 1**), vemos que a diferença é justamente a presença ou não desse excipiente. Na formulação S6, o X3 foi substituído pelo X9. Inicialmente não observamos diferença na ausência/presença do X3 na estabilização da formulação, uma vez que o ITZ em ambas as formulações precipitou dentro de 24h e houve aumento na quantidade de precipitado, bem como amarelamento.

Entretanto, ao compararmos as formulações S6 e S7 (**ANEXO 1**), embora tenha sido possível observar ITZ precipitado nas duas formulações após 24h, na formulação S7, mesmo com uma maior proporção de X1, há mais precipitado no fundo do frasco (**Figura 14**). Dessa forma, levantamos a hipótese de que o X3 era capaz de interferir na estabilização do ITZ em solução. Com o objetivo de confirmar essa hipótese, avaliamos formulações equiparáveis (S14 e S16, **ANEXO 1**), à exceção da presença do X3. Na formulação que não continha X3 (S16, **ANEXO 1**) observamos precipitado dentro de 24h, enquanto a formulação com X3 (S14, **ANEXO 1**) houve precipitado apenas após 3 dias (**Figura 20**). Adicionalmente, dentro de um mesmo intervalo de tempo, observamos novamente uma maior quantidade de ITZ precipitado na formulação S16 (**Figura 20**). Este resultado está em concordância com outro estudo publicado que ao desenvolveu nanopartículas de ITZ solubilizado em X3 e observaram que quanto maior a quantidade desse excipiente, maior a quantidade de ITZ solubilizado e melhor a estabilização do sistema.



**Figura 20:** Formação de precipitado de itraconazol nas formulações S14 e S16, em um mesmo intervalo de tempo. As setas vermelhas sinalizam o aparecimento de precipitado no frasco.

A **Figura 21** ilustra o aspecto das formulações S29-S32 (**ANEXO 1**), que correspondem a pares de comparação do X3 (S29xS30 e S31xS32) com 3% p/p (S30 e S32) e 5%p/p (S29 e S31). Como pode ser observado, nas quatro formulações foi identificada a presença de cristais de ITZ dentro de 7 dias, formando uma fina camada de precipitado no fundo, mas de fácil ressuspensão. No entanto, na S29 há menos precipitado (pequenos cristais em formato de agulha) e um amarelamento bem suave. Nas demais o amarelamento foi mais intenso. Quando comparamos a composição dessas formulações, vemos que a diferença da S29 para as demais é a presença de 5% de X3 e a substituição do X7 pelo X4, fornecendo um indício que o X7 pode auxiliar no processo de amarelamento e que o X3 à 5% pode ser mais promissor.



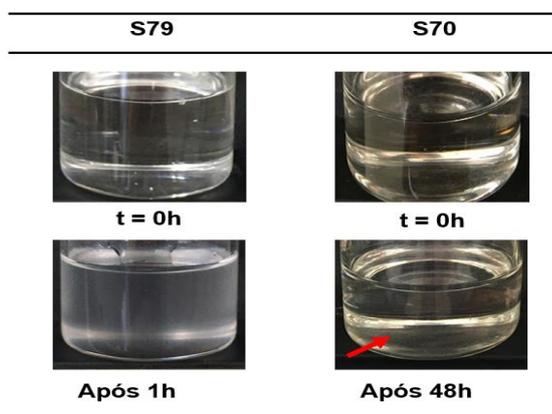
**Figura 21:** Formulações S29 a S32 após seu preparo (0h) e após precipitação (7 dias). As setas vermelhas destacam a presença do precipitado de itraconazol.

#### 5.2.4 X8

Outro componente de baixa polaridade e baixa constante dielétrica que também foi avaliado no desenvolvimento das formulações foi o X8, que é relatado como um bom cossolvente para o ITZ e promotor de permeação cutânea.

Ao longo do tempo foram avaliadas diferentes concentrações do X8, variando de 21,5% (S79) a 40% p/p (S70) (**ANEXO 1**). Entretanto, tanto as formulações com menor como com maior concentração apresentaram instabilidade dentro de 01-48h (**Figura 22**). Na S79, após 1h de preparo, o sistema turvou e ao longo do tempo foi possível observarmos a formação de grande quantidade de ITZ precipitado, além de amarelamento. No entanto, não houve separação de fases. Acreditamos que a turvação pode ser decorrente da adição do X12 à formulação (7% p/p), que apresenta características hidrofílicas. Já na S70, após 48h foi observado ITZ precipitado, que aumentou ao longo do tempo, mas sem amarelamento da solução (**Figura 22**, seta vermelha). Embora outros excipientes também tenham variado, esses resultados nos mostram que X8, mesmo a 40%, não é suficiente para estabilizar o ITZ.

Em um estudo conduzido por Hernandez e colaboradores (2019) foi identificada a migração do X8 para a fase aquosa de uma emulsão, sendo esse o principal mecanismo identificado para desestabilização da formulação. Assim, o X8 pode ter interagido com cadeias polares dos outros excipientes, levando à desestabilização e precipitação do ITZ. No entanto, como em concentrações menores (~20%) observamos turvação, optamos por manter a concentração em torno de 30% p/p.

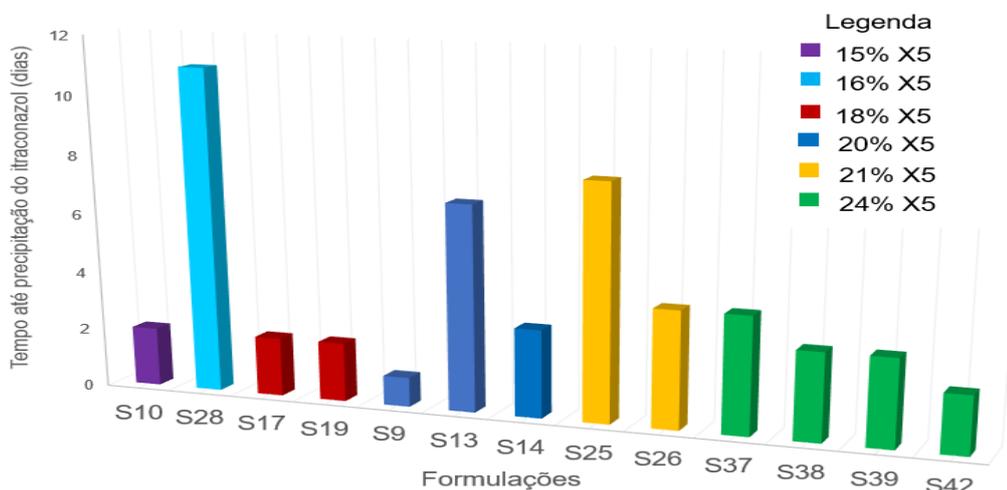


**Figura 22:** Aspecto visual das formulações S79 e S70 após o preparo (t = 0h) e após 1 hora e 48 horas, respectivamente. A seta vermelha destaca a formação de precipitado no fundo do frasco.

### 5.2.5 X5

Outro excipiente extensivamente avaliado foi o X5, que apresenta capacidade de aumentar a permeabilidade de fármacos na pele, e é descrito como bom cossolvente para o ITZ.

Quando avaliamos as formulações S6 e S7 (**ANEXO 1**), que contêm, respectivamente, 15 e 10 % p/p de X5, e 6 e 10% p/p de X1, observamos que há formação de precipitado em ambas as formulações dentro de 24h. Porém, na S7 foi formada uma camada expressiva de ITZ precipitado (**Figura 14**). Esse resultado nos forneceu um indício de que, assim como o X3, o X5 também contribui para uma maior estabilização do ITZ, mesmo com uma menor concentração do X1. Dessa forma, avaliamos diferentes concentrações de X5 (15 a 24 % p/p), mantendo concentrações fixas dos principais solventes: 10% de X1, 5% de X3 e 10% de X2 (S9, S10, S13, S14, S28, S17, S19, S25, S26, S37-S39 e S42, **ANEXO 1**). Quando analisamos essas formulações, é possível observar que a formulação contendo 16 % (S28) apresentou o melhor desempenho (**Figura 23**), mantendo-se sem precipitado de ITZ por 11 dias. No entanto, ao longo dos meses a formulação turvou e apresentou muitos cristais de ITZ, formando uma camada de pó no fundo do frasco, além de um leve amarelamento.

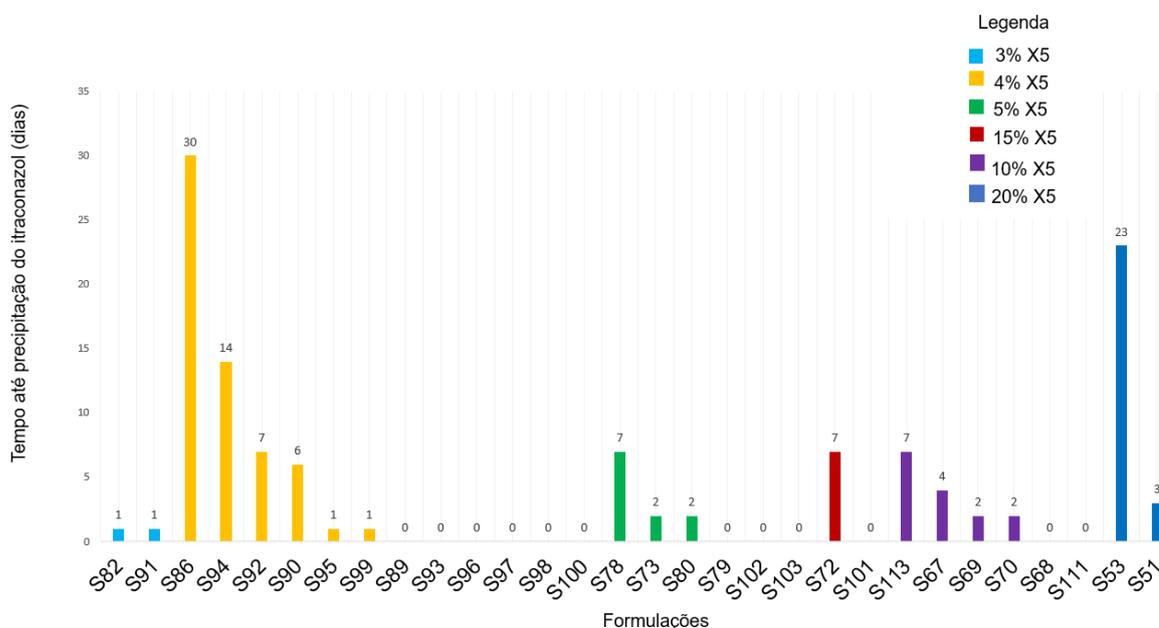


**Figura 23:** Relação entre o tempo de aparecimento de precipitado de itraconazol e a concentração de X5 em diferentes formulações.

Na sequência, avaliamos a manutenção da concentração do X5 em 16% p/p e aumento do X1 para 13 e 15 % p/p (S29 x S31 e S30 x S32, **ANEXO 1**). Todas as formulações precipitaram após 7 dias (**Figura 21**), mostrando que a redução de outros

excipientes para aumentar a porcentagem do X1 impactou negativamente na estabilidade, mesmo sendo o X1 o principal solvente. Adicionalmente, como já observado, a S29 apresentou o melhor perfil ao longo dos meses.

Sabendo da importância do X1 e do X3 para a solubilização do ITZ, foi proposta a avaliação da variação do X5, entre 3 e 20% p/p, mantendo fixa a concentração do X1 (15% p/p) e X3 (5% p/p) (S51, S53, S67-S73, S78-S80, S82, S84, S86, S89-S103, S111 e S113, **ANEXO 1**). Ao avaliarmos a **Figura 24** observamos que o aumento na concentração do X5 nem sempre resultou em uma melhor estabilização do ITZ. Nas formulações avaliadas, o melhor resultado foi obtido para a S86, que apresentava apenas 4% p/p de X5. Este resultado, entretanto, foi importante para verificarmos que a diminuição do X5 nem sempre impactaria negativamente na estabilização do ITZ se outros excipientes com propriedades anfílicas fizessem parte da formulação, como o X12 (S86). Importante observar que as melhores formulações apresentaram evoluções distintas. Na S86 houve separação de fases e leve amarelamento, mas poucos cristais em formato de agulha e de fácil ressuspensão. Na S53 houve aumento dos cristais (grandes e compactados) e forte amarelamento. Já a S94 apresentou separação de fases e deposição de uma fina camada de ITZ, mas sem amarelamento.

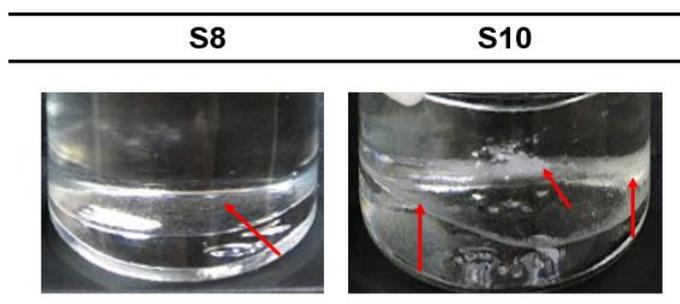


**Figura 24:** Impacto das diferentes concentrações do X5 na manutenção do itraconazol em solução em formulações com concentrações fixas de X1 (15% p/p) e X3 (5% p/p).

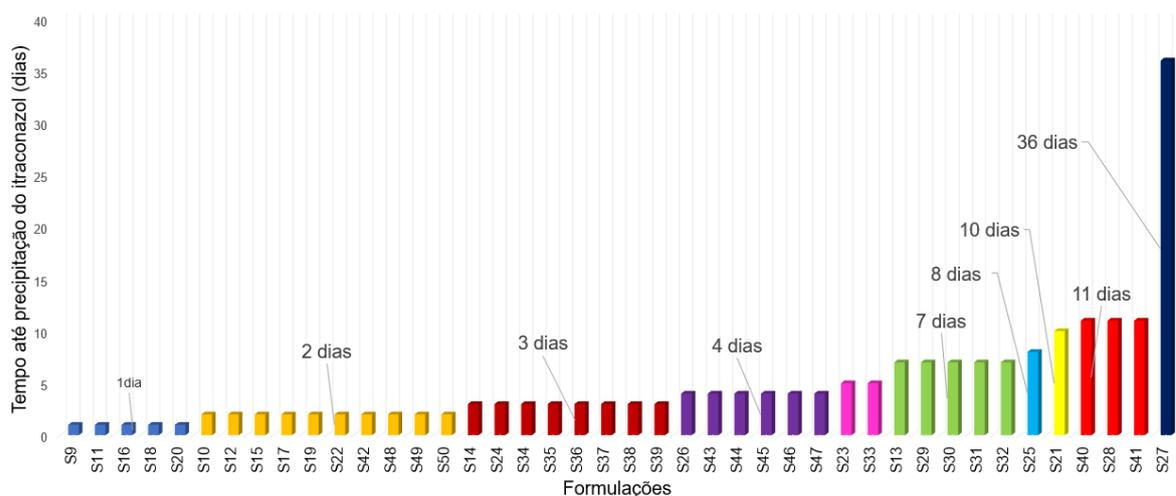
### 5.2.6 X2

O X2 é um excipiente utilizado como solvente e promotor de permeação cutânea em formulações tópicas. Como apresentou boa capacidade de solubilização do ITZ, seu uso foi proposto em quase todas as formulações desenvolvidas. Inicialmente a concentração de 5% p/p foi avaliada (S1-S8, **ANEXO 1**). No entanto, como já discutido, em nenhuma dessas formulações foi possível manter o ITZ em solução, sendo observado precipitado pouco tempo após a produção. Assim, propusemos aumentar esse excipiente para a concentração máxima recomendada pelo fabricante (10%). Porém, quando comparamos a formulação S8 (5% p/p de X2) com a S10 (10% p/p) (**ANEXO 1**), em ambas foi observado ITZ precipitado dentro de 24h (**Figura 25**). Dessa forma, a S10 não apresentou a estabilidade desejada, mesmo com 10% de X2 e uma proporção maior de X5, que é um bom solvente para o ITZ. Além disso, ambas as formulações apresentaram aumento de ITZ precipitado ao longo dos meses e amarelamento.

Apesar do resultado inicial não ter sido promissor, como a interação entre excipientes é crucial na estabilização do fármaco, optamos por avaliar a X2 em diferentes formulações mantendo a concentração de 10% p/p (S9-S50, **ANEXO 1**). A **Figura 26** ilustra os resultados obtidos. Como é possível observar, na maior parte das formulações o ITZ manteve-se totalmente solubilizado por apenas 2, 3 e 4 dias. Destaca-se apenas a formulação S27, que se manteve sem precipitado de ITZ por 36 dias. Porém, nessa formulação foi utilizada uma concentração mais elevada de X1 (18%). Adicionalmente, ao longo dos meses observamos intensa precipitação do ITZ. Embora os cristais formados sejam de fácil ressuspensão, a precipitação foi tão intensa que a formulação fica ligeiramente turva quando submetida à agitação.

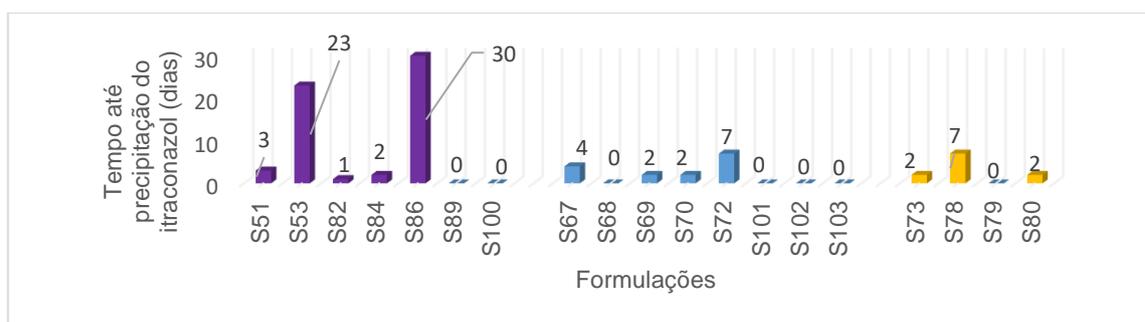


**Figura 25:** Formulações S8 e S10 contendo, respectivamente, 5 e 10% p/p de X2 após 24h do seu preparo. As setas vermelhas evidenciam a formação de ITZ precipitado.



**Figura 26:** Variação na estabilização do ITZ em diferentes formulações contendo 10% p/p de X2.

Optamos então por avaliar diferentes formulações contendo 5% (S79, S78-S80), 6% (S51, S53, S82, S84, S89-S100) e 8% p/p (S67-S72, S101-S103) (**ANEXO 1**). Como pode ser observado na **Figura 27**, as formulações S53 e S86, ambas com 6% p/p de X2, 15% de X1 e 5% de X3, foram as que apresentaram os maiores tempos de estabilização do ITZ. Apesar de compreendermos que os outros excipientes também influenciam no comportamento da formulação, o resultado nos motivou a prosseguir com o X2 a 6% p/p.



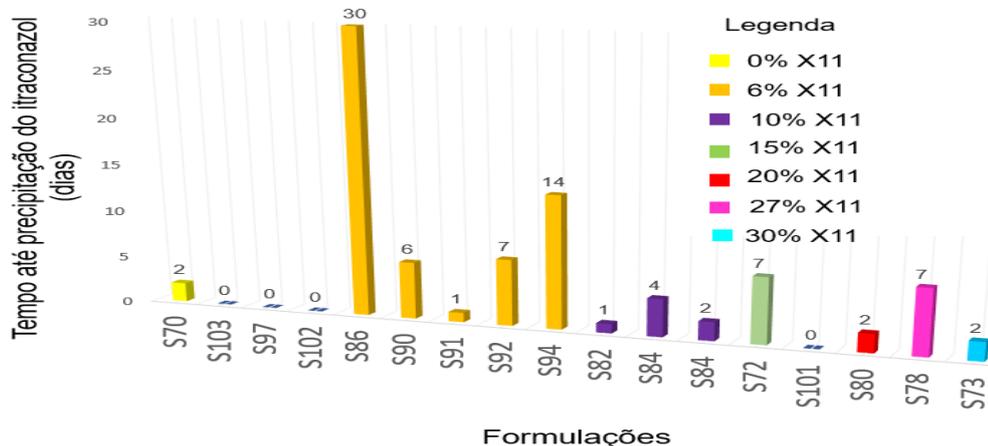
**Figura 27:** Influência da concentração de X2 no tempo de precipitação do itraconazol em diferentes composições de formulações.

### 5.2.7 X11

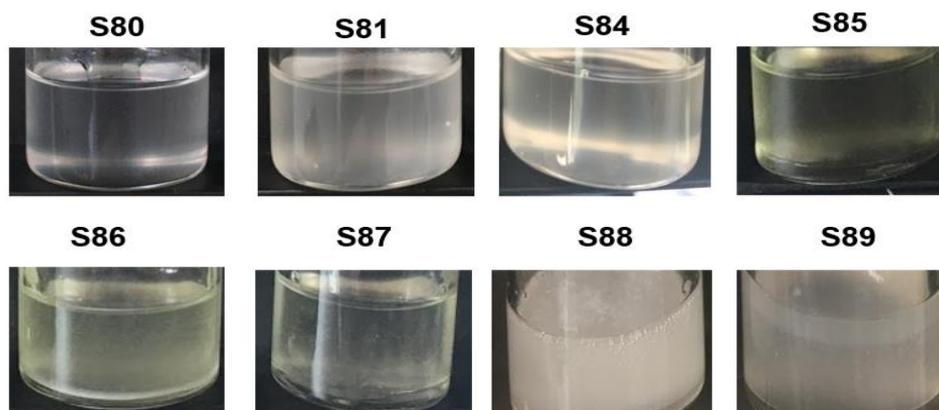
O X11 também foi avaliado na formulação como uma estratégia para melhorar a solubilidade do ITZ. Há relato de que o X11 seja capaz de solubilizar 5,22 mg de ITZ. Adicionalmente, os tocoferóis presentes em sua composição podem minimizar processos oxidativos. É relatado na literatura a utilização de X11 em concentrações

de até 30% para produzir microemulsões de ITZ. Porém, optamos por avaliá-lo inicialmente na concentração de 15 % p/p (S72, **ANEXO 1**). Quando comparamos as formulações S70 e S72 (**ANEXO 1**), que apresentam composições parecidas, foi possível observar um maior tempo de manutenção do ITZ solubilizado na formulação com X11 (S72) (**Figura 28**). A partir deste resultado, avaliamos várias concentrações do X11: S73 (30%), 78 (27%), S80 (23%), S101 (20%), S82-S85 (10%), S86-96 +S98-99 (6%), S102 (5%), S97 (4%) e S103 (3%) (**ANEXO 1**).

Os melhores resultados de estabilização do ITZ foram observados para S86 e S94, ambas com 6% p/p de X12, que não apresentaram precipitados em 30 e 14 dias, respectivamente (**Figura 28**). Entretanto, posteriormente foi observada separação de fases em ambas as formulações. Essa desestabilização foi possivelmente decorrente da alta concentração de X12, respectivamente 15 e 12%, frente à alta carga lipídica das formulações. A **Figura 29** ilustra o aspecto de algumas das formulações com X12, onde é facilmente observada uma turbidez, diferentemente do aspecto límpido observado nas formulações anteriores. Adicionalmente, nas formulações S82-S88, S94 e S102-S103 foi observada separação de fases ao longo do tempo e, com exceção da S91, todas amarelaram.

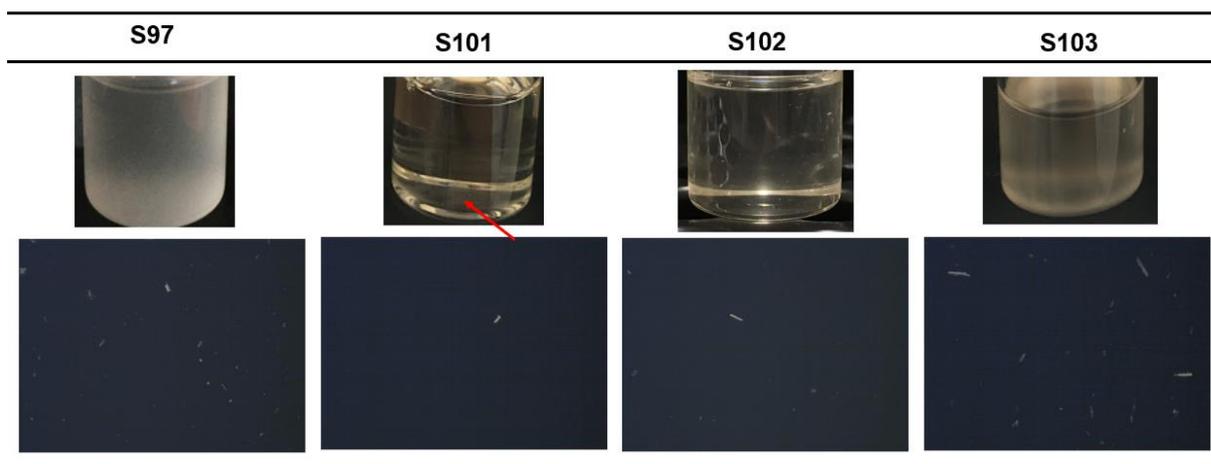


**Figura 28:** Comparativo entre a relação da concentração de X11 (% p/p) e o tempo até aparecimento de precipitado de itraconazol em diferentes formulações.



**Figura 29:** Aspecto macroscópico das formulações S80, S81, S84, S85, S86, S87, S88 e S89 logo após seu preparo. Observa-se turvação do sistema devido à alta carga lipofílica frente ao aumento da concentração de X12, sendo observada separação de fases ao longo do tempo.

Com relação às formulações S97, S101, S102 e S103 (**ANEXO 1, Figura 30**), que apresentaram o pior perfil, com rápida precipitação de ITZ, também pode ter ocorrido incompatibilidade entre os excipientes. Nas formulações S97, S102 e S103 foram adicionados excipientes com características mais hidrofílicas, como X12, X16 (HLB 18-23, BASF) e/ou X18. Esses excipientes, além de ocasionarem turbidez, podem ter interagido com o X1, deixando-o menos disponível para o ITZ. Tanto a S102 como a S103 apresentaram separação de fases e amarelamento; e a S97 ficou turva, com aspecto mais branco, provavelmente devido à precipitação do X18 e do X17. Já na S101 (**ANEXO 1, Figura 30**), a remoção de alguns excipientes com características mais anfífilas também contribuiu negativamente para a estabilização do ITZ, mostrando a necessidade de equilíbrio entre os excipientes selecionados devido ao comportamento anfílico do fármaco. Não foi observado amarelamento na S101. Já na S90 e S92 formou-se uma fina camada de ITZ precipitado, mas sem amarelamento. A S78 amarelou muito e formou grande quantidade de precipitado de fácil ressuspensão. A S72 também amarelou e formou precipitado de fácil ressuspensão, mas em menor quantidade que na S78.

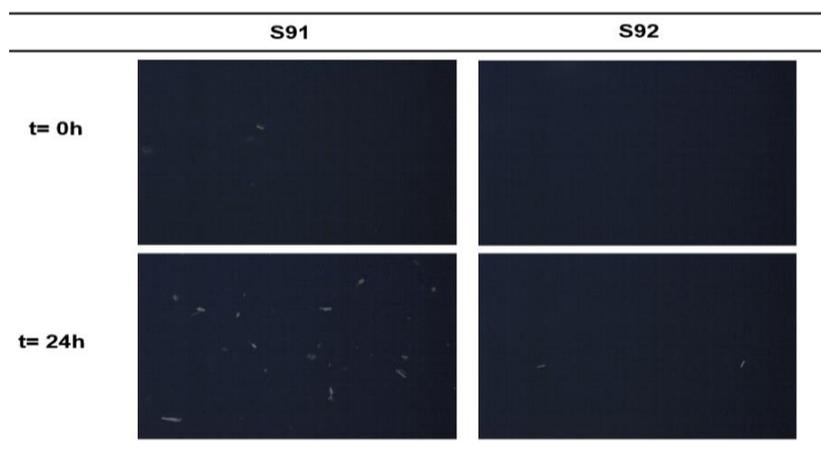


**Figura 30:** Aspecto macro e microscópico das formulações S97, S101, S102 e S103. Na seta vermelha destaca-se a formação de precipitado no fundo do frasco.

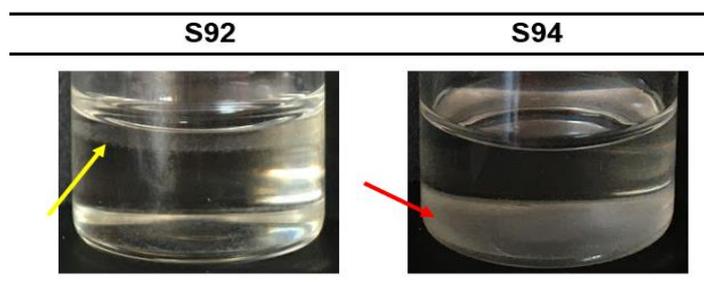
### 5.2.8 Surfactantes

Devido à baixa solubilidade do ITZ nos excipientes oleosos e a uma afinidade com excipientes anfífilos, também avaliamos alguns surfactantes, com ênfase naqueles que apresentavam cadeias peguadas em sua estrutura química. O X13 foi o primeiro surfactante proposto, devido ao potencial de solubilização de fármacos pouco solúveis. Esse excipiente foi avaliado nas concentrações (p/p) de 10% (S1 a S12), 8% (S13 a S16), 7% (S17 a S20), 5% (S21 a S26), 3% (S27 a S32 e S92 a S99) e 0,5% (S51 e S52) (**ANEXO 1**). Dessas formulações, destaca-se a formulação S27 que não apresentou precipitado de ITZ por 36 dias (**Figura 26**). Infelizmente, na maioria das formulações avaliadas não foi possível identificar uma melhora potencial na estabilização do ITZ.

Nesse sentido, a partir da S33, o X13 foi descartado; tendo sido novamente avaliado a 3% p/p a partir da S92, quando adicionamos excipientes com características mais anfífilas (**ANEXO 1**). Ao compararmos S91 com a S92 (**ANEXO 1**), percebemos uma pequena melhora na estabilização do ITZ dentro de 24h. Porém, ainda foram observados cristais do fármaco em solução (**Figura 31**). O X13 (3% p/p) ainda foi avaliado em outras formulações (S94-S99). Entretanto, a partir da formulação S100 (**ANEXO 1**), foi novamente removido, pois continuávamos observando separação de fases (S92, seta amarela, **Figura 32**) e precipitação do ITZ (S94, seta vermelha, **Figura 32**) dentro de 24h. Ao longo do tempo, também observamos separação de fases e precipitação do ITZ em ambas as formulações, mas sem amarelamento.

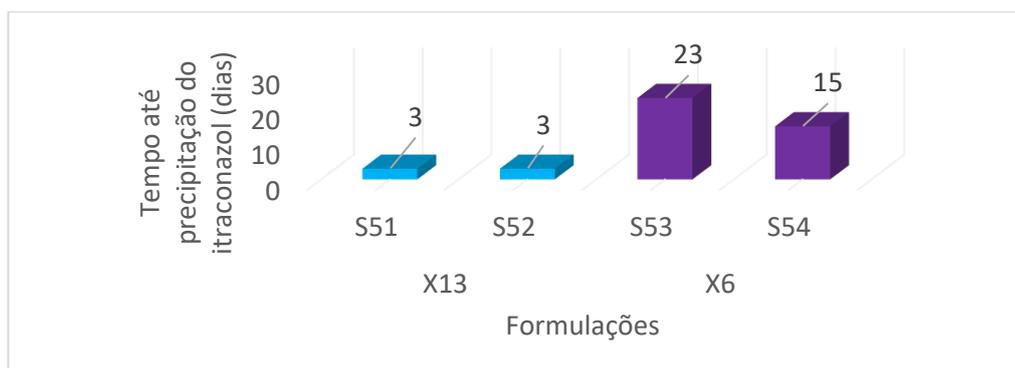


**Figura 31:** Presença de cristais de itraconazol nas formulações S91 e S92 observados em microscópio de luz polarizada, nos tempos 0 e 24h.



**Figura 32:** Aspecto macroscópico das formulações S92 e S94. Na seta amarela destaca-se a separação de fases e na seta vermelha destaca-se a formação de precipitado.

Outro excipiente avaliado durante o desenvolvimento das formulações foi o X6, que é apontado como substituto de solventes orgânicos. Nas primeiras formulações, em concentração igual a 0,5% p/p, o X6 foi avaliado como potencial substituinte do X13 (S51 x S53 e S52 x S54, **ANEXO 1**). Como pode ser observado na **Figura 33**, as formulações S53 e S54, que continham X6, mantiveram-se estáveis por mais tempo quando comparadas àquelas que continham X13 (S51 e S52).



**Figura 33:** Comparação entre a influência do X13 e X6 no tempo de aparecimento de precipitado de itraconazol (formulações S51, S52, S53 e S54).

A partir do resultado acima, o X6 foi avaliado em diferentes concentrações (S52 a S103, **ANEXO 1**). De maneira geral, apesar de ter-se mostrado mais promissor que o X13, a remoção de outros excipientes para aumentar a concentração do X6 não refletiu positivamente. Na **Figura 19** observamos cristais de ITZ dentro de 48h em formulações com 2,5 a 5,5% p/p de X6 (S56-58 e S61-62). Este resultado ilustra quão complexo é o processo de estabilização do ITZ em uma solução.

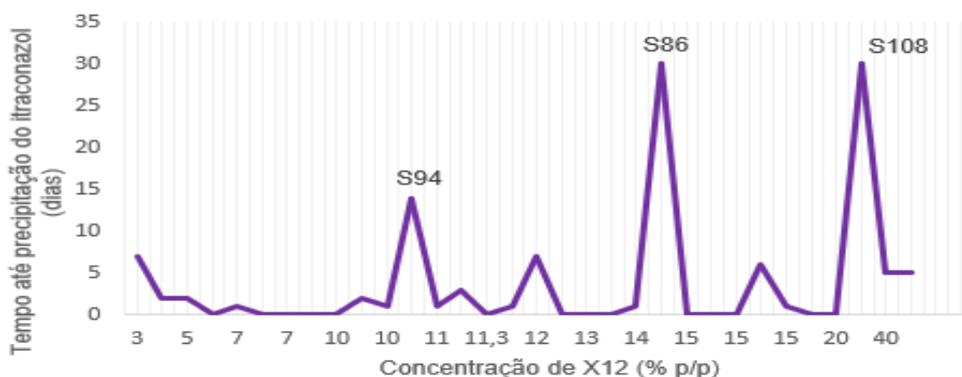
Há na literatura a descrição da mistura de X6 e X13 (proporção molar 1:5) na solubilização de cerca de 7,545 mg/mL de ITZ. Assim, avaliamos a associação desses dois surfactantes (S92, S94 a S99, **ANEXO 1**). Entretanto, a mistura proposta não foi capaz de estabilizar o ITZ, sendo observado precipitado logo após o preparo em quase todas, à exceção das S92 e S94, que não apresentaram precipitado de ITZ por 7 e 14 dias, respectivamente.

#### 5.2.9 X12

Em virtude da dificuldade de manutenção do ITZ em solução e do melhor entendimento do comportamento do fármaco, foi proposta a inserção do X12. A solubilidade do ITZ neste excipiente já é relatada na literatura, visto que o ITZ é capaz de formar ligação de hidrogênio com os grupos de óxido de polietileno.

O X12 é um excipiente de baixa irritabilidade, sendo utilizado em concentrações de até 30% v/v como veículo de formulações injetáveis (ROWE *et al.*, 2009) e até 60% p/p para produção de pomadas de aplicação tópica. Assim, avaliamos o X12 em diferentes concentrações (p/p): S78 (3%), S80-81 (5%), S79 + S82-83 + S102 (7%), S96 (9,5%), S84-85+ S111 (10%), S94 (10,5%), S95 + S103 (11%), S98 (11,3%), S99 (11,5%), S97 (13%), S92-93 (12%), S104-105 (14%), S86-91 (15%), S106 (20%), S100 (21%), S107-108 (30%) e S109-110 + S112 (40%) (**ANEXO 1**). A **Figura 34** ilustra a relação entre o aumento do X12 e o tempo até a identificação de ITZ precipitado. Como pode ser observado, não existe uma relação linear. Entretanto, as melhores formulações apresentavam entre 10,5, 15 e 30 % p/p de X12. O X12 também impactou positivamente no processo de produção, auxiliando na solubilização do X16, que contribuiu para o aumento da viscosidade.

Apesar da melhora na estabilização do ITZ, observamos turvação do sistema e separação de fases, como descrito acima (**Figura 30**). Portanto, a partir da formulação S104, removemos o X11, buscando mitigar a separação de fases.



**Figura 34:** Relação não-linear entre a concentração de X12 e o número de dias até a identificação de itraconazol precipitado nas formulações.

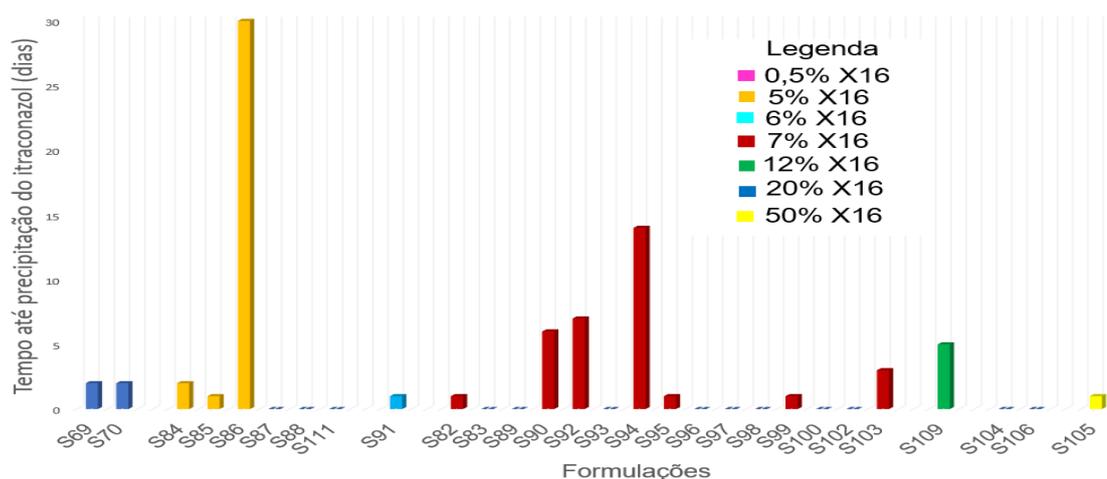
#### 5.2.10 Polímeros com propriedades surfactantes

Frente à dificuldade em estabilizar o ITZ em solução, avaliamos polímeros para doar viscosidade ao sistema como uma ferramenta para diminuir o processo de recristalização do fármaco e ir de encontro a uma demanda da veterinária. Embora no desenho inicial da formulação tenha sido proposta uma solução bem fluida, baseada em formulações do tipo *pour-on*, que são muito empregadas na medicina veterinária, ao estudar os aspectos clínicos da esporotricose felina, verificou-se que esse não seria o desenho ideal para todos os tipos de lesão. Como são muito comuns lesões faciais na esporotricose felina (GREMIÃO *et al.*, 2020), uma formulação menos fluida minimizaria o risco de interação com os olhos do animal. Assim, avaliamos a inserção de polímeros com propriedades surfactantes.

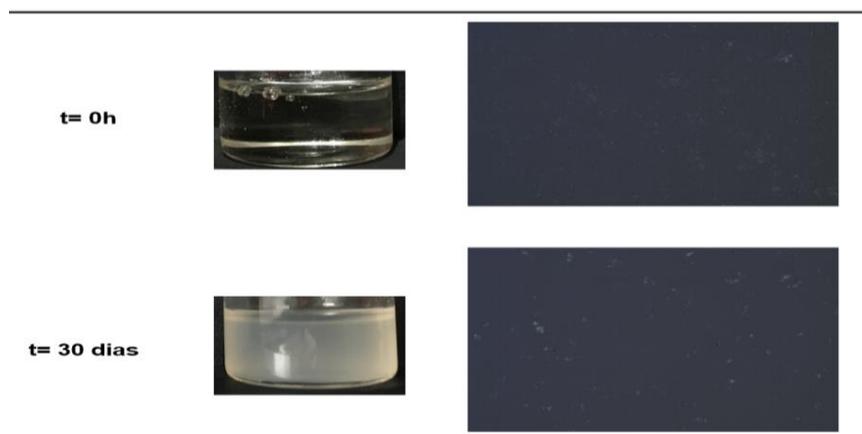
Inicialmente, optamos por utilizar o X19 com o intuito de aumentar a viscosidade e estabilidade das formulações. Entretanto, como será discutido no tópico 5.2.11, as formulações apresentaram baixa estabilidade. Dessa forma, propusemos avaliar o X16. Quando comparamos as formulações S67 e S69, em que a única diferença é a presença do X19 ou do X16, observamos que a formulação com X19 (S67, **ANEXO 1**) manteve-se estável por quatro dias enquanto a com X16 (S69, **ANEXO 1**) por apenas dois. A associação entre os dois excipientes (S70, **ANEXO 1**) também não se mostrou benéfica, pois a formulação apresentou precipitado de ITZ em dois dias.

Apesar desse resultado, optamos por substituir o X19 pelo X16, uma vez que esse excipiente apresenta potencial de diminuir a sedimentação de precipitados. O X16 foi avaliado em diferentes concentrações: S69-70 (0,5%), S84-87+S111 (5%), S91 (6%), S82-83+S89-90+S92-99+S102-103 (7%), S112 (10%), S109 (12%), S104+106+110 (20%), S108 (25%) e S107 (30%) (**ANEXO 1**). Como pode ser observado na **Figura 35**, de maneira geral, as formulações que se mantiveram mais estáveis (S86 e S94) apresentavam, respectivamente, 5% e 7% p/p de X16, em um sistema que ainda continha alta carga lipídica, devido à presença do X14 e X11. Assim, como já mencionado anteriormente, problemas de separação de fases foram observados na maioria dessas formulações (**Figura 30**).

Optamos então por avaliar formulações com uma maior proporção de polímeros hidrofílicos a partir da formulação S104 (**ANEXO 1**). As formulações S107 e S110, com 30 e 50% p/p de X16, respectivamente, apresentaram-se muito viscosas e com aspecto extremamente pegajoso, sendo descartadas. Já a S108, com 25% p/p, apresentou-se incolor logo após o preparo e turvou após 24h, formando uma suspensão polimérica, sem a presença de cristais de ITZ (**Figura 36**). As S109 e S112 (**ANEXO 1**), com 12 e 5% p/p de X16, respectivamente, apresentaram comportamento parecido com a S108. Entretanto, após 5 dias foram encontrados polímero e cristais de ITZ; sendo que na S112 foi formada uma massa sólida sedimentada, de difícil ressuspensão.

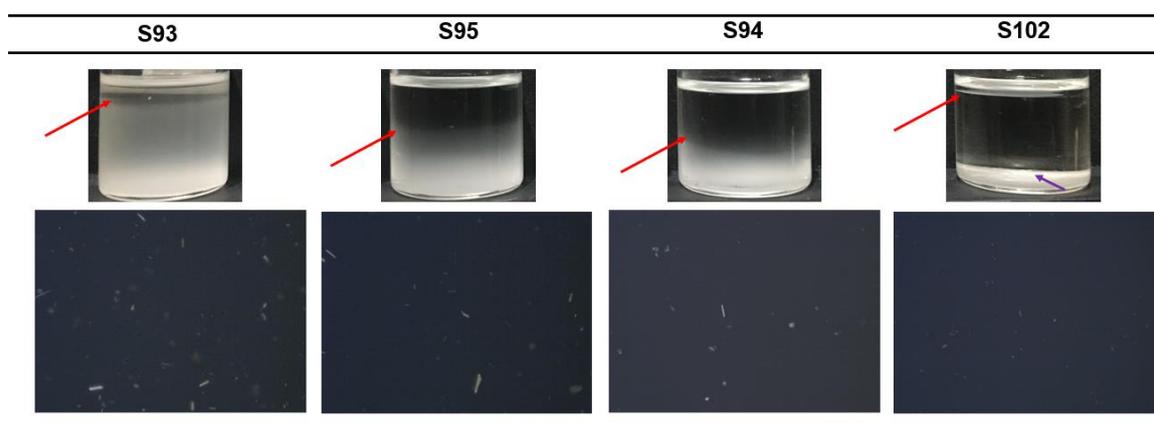


**Figura 35:** Relação entre concentração de X16 e tempo até identificação de itraconazol.



**Figura 36:** Aspecto macro e microscópico da formulação S108 logo após seu preparo ( $t= 0h$ ) e após 30 dias.

Também avaliamos a associação do X16 ao X17, cuja associação é relatada como positiva na inibição da precipitação de fármacos pouco solúveis em sistemas auto emulsificantes. O X17 foi avaliado nas concentrações de 0,25% (S102-S103), 0,5% (96-S100), 1% (S95), 1,5% (S94) e 3% (S93) (**ANEXO 1**). Como pode ser observado na **Figura 37**, nessas formulações foi observada separação de fases após 15 dias, precipitação do polímero e ITZ. É importante salientar que o X17 é relatado como estabilizante em diferentes formulações, em concentrações que variam entre 0,05 - 2% p/v. Entretanto, no desenho das formulações propostas, sua inserção não se mostrou benéfica.



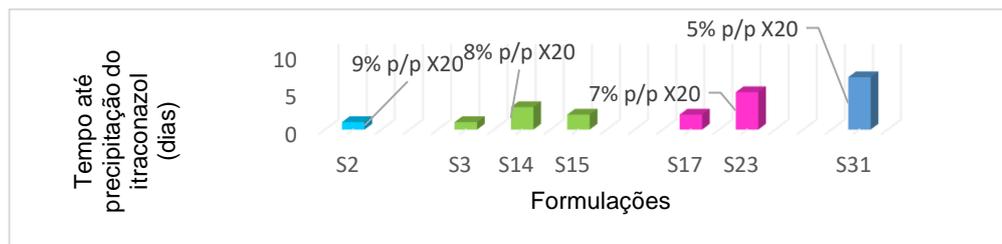
**Figura 37:** Aspecto macro e microscópico das formulações S93, S95, S94 e S102, com diferentes concentrações de X17, após 15 dias de preparo. As setas vermelhas sinalizam a separação de fases e a seta roxa a formação de precipitado. Em todas as figuras microscópicas é possível observar a presença de cristais de ITZ.

### 5.2.11 Outros excipientes

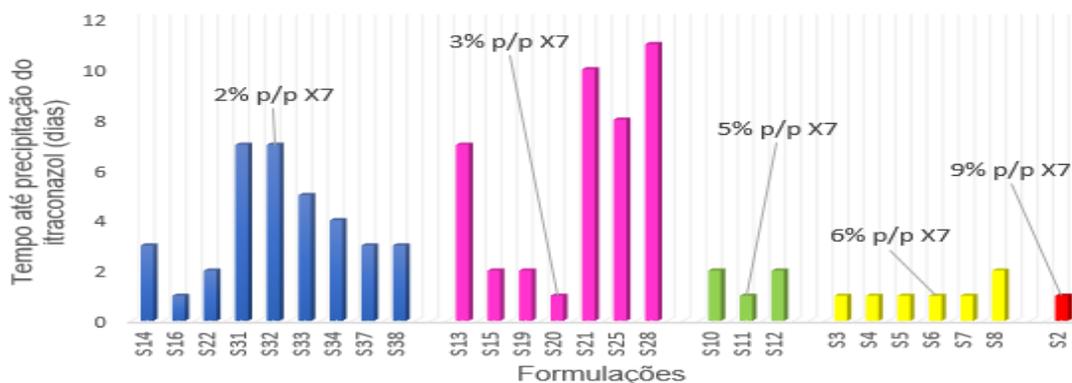
O X20 é um excipiente com propriedades emoliente e surfactante amplamente utilizado na indústria farmacêutica e de cosméticos, sendo aplicado como veículo para fármacos com baixa capacidade de permeação na pele (ROWE *et al.*, 2009). No presente estudo avaliamos este excipiente em quase todas as formulações, sempre em concentração menor do que 10%, devido ao risco de comedogênese (BASF, 2015). A propriedade surfactante, além emoliente, foi considerada na seleção.

Nas primeiras formulações (S1 e S2, **ANEXO 1**), o X20 foi avaliado a 5 e 9% p/p, sendo observada precipitação do ITZ dentro de 24h. Na sequência, em conjuntos com outros excipientes, avaliamos a 8% (S3-S16), 7% (S17-23 + S25-S26 +S28), 5% (S24 + S27 + S29-S104 + S106+ S113) e 4% p/p (S111) (**ANEXO 1**). Como pode ser observado na **Figura 38**, o X20 parece não influenciar diretamente na manutenção do ITZ solubilizado. Entretanto, visando sua propriedade emoliente, foi mantido a 5% p/p, sendo removido apenas nas formulações com alta carga de excipientes com características hidrofílicas (S105, S107-S110 e S112), buscando mitigar a separação de fases que vinha sendo observada.

Outro excipiente avaliado desde o início foi o X7, devido às propriedades emolientes, por interagir facilmente com a água, melhorando a hidratação do tecido, e à ampla utilização em formulações tópicas. O X7 foi avaliado a 2% (S14, S16, S22, S31-S34 e S37-S38), 3% (S13, S15, S19-S21, S25 e S28), 5%p (S10-S12), 6% (S3-S8) e 9% p/p (S2) (**ANEXO 1**). A **Figura 39** resume os resultados obtidos para a relação concentração de X7 e a estabilização de ITZ. Como pode ser observado, em boa parte das melhores formulações foi utilizado 2 e 3% p/p de X7. Porém, em nenhuma delas o ITZ manteve-se completamente solúvel por mais 11 dias. Assim, buscando otimizar a estabilização do ITZ em solução, avaliamos uma possível substituição do X7 pelo X4 (S25 x S26, **ANEXO 1**). O X4 é um emoliente amplamente utilizado, sendo capaz de formar uma barreira lipídica na superfície da pele, minimizando a saída de água do tecido.

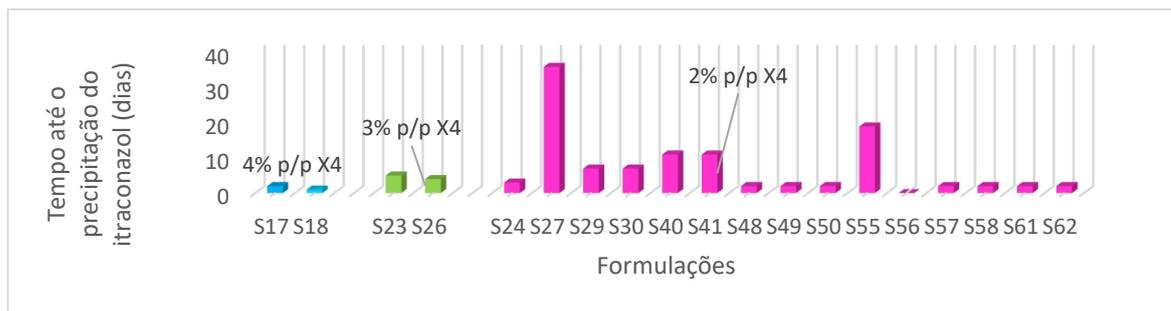


**Figura 38:** Influência da concentração do X20 no aparecimento de precipitado de itraconazol nas formulações S2, S3, S14, S15, S17, S23 e S31.



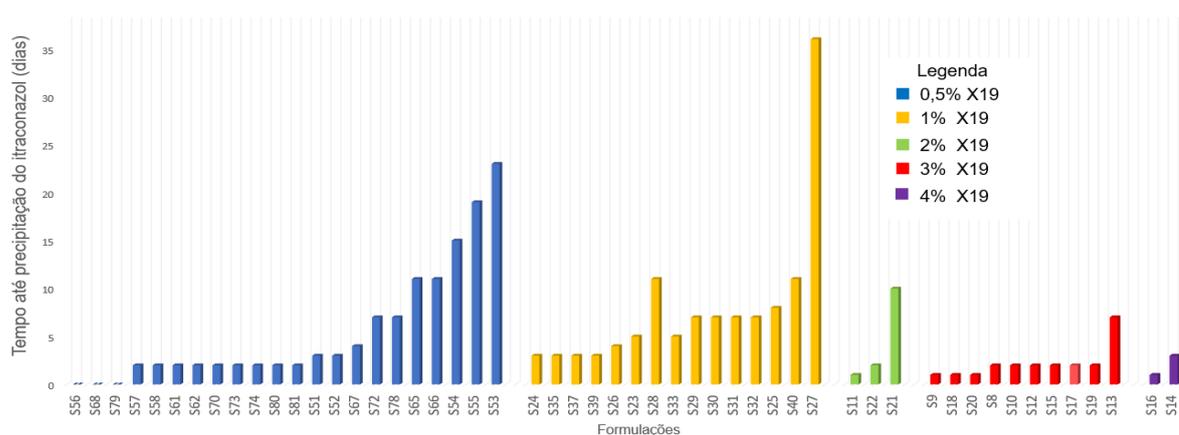
**Figura 39:** Influência da concentração de X7 e o aparecimento de precipitado de itraconazol em diferentes formulações.

O X4 já havia sido avaliado inicialmente na S17 (**ANEXO 1**) associado ao X7, sendo visualizado ITZ precipitado dentro de 24h. Quando avaliamos as formulações S25 e S26, observamos que a que continha X7 (S25) permaneceu por 8 dias sem precipitado, enquanto a S26 precipitou na metade do tempo (S26). Foi observado também que, ao longo dos meses, ambas as formulações amarelaram, entretanto S26 apresentou maior quantidade de fármaco precipitado. Assim, avaliando o conjunto de formulações com X4 (**Figura 40**), observamos que, embora tenhamos observado uma formulação que permaneceu sem ITZ precipitado por mais tempo (S27), este excipiente não se mostrou determinante na estabilização do ITZ em solução.



**Figura 40:** Influência da concentração do X4 em concentrações de 2, 3 e 4% p/p no aparecimento de precipitado de itraconazol em diferentes formulações.

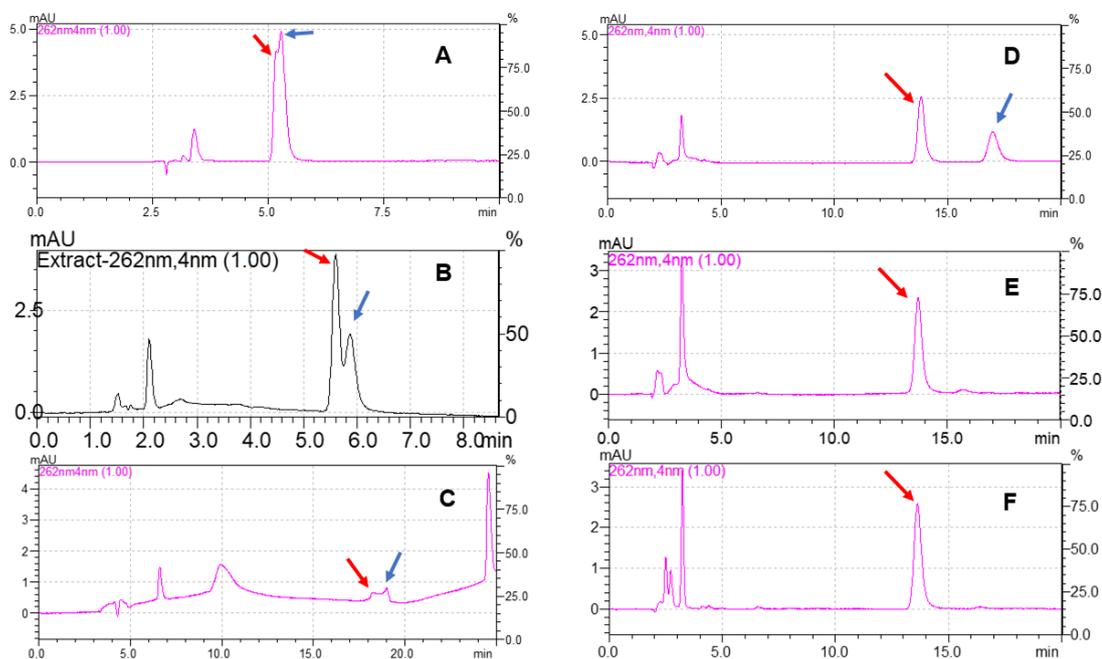
O X19 é uma mistura de álcoois alifáticos sólidos, muito empregada no desenvolvimento de produtos tópicos, sendo utilizada como emulsificante e agente de viscosidade (ROWE *et al.*, 2009). Assim, foi adicionado à formulação com o objetivo de interagir com outros excipientes e auxiliar na estabilização e adesividade da formulação. Foi avaliado em concentrações (p/p) de 4% (S14 e S16), 3% (S8-S10 + S12-S20), 2% (S11, S21-S22), 1% (S23-S33 + S35, S37, S39-S40) e 0,5% (S51-S58, S61-S62, S65-S68, S70-S74 e S78-S81) (**ANEXO 1**). Como pode ser observado na **Figura 41**, a maior parte das formulações apresentou estabilidade menor do que 10 dias. Os melhores resultados foram obtidos com 0,5% p/p de X19, com exceção da S27, mas que tinha uma alta carga de X1 e depois 36 dias apresentou extensiva precipitação de ITZ. Assim, a concentração de 0,5% foi mantida em várias formulações, sendo este excipiente removido a partir da S82.



### 5.3 Desenvolvimento do método analítico por cromatografia a líquido de alta eficiência para quantificação do itraconazol nas formulações

#### 5.3.1 Avaliação da seletividade

Para avaliar a seletividade do método, injetamos amostras das formulações (oleosas e poliméricas) em diferentes condições. Devido à presença de X3, muitas condições foram avaliadas, como uma coluna maior e diferentes comprimentos de onda, posto que o tempo de retenção desse excipiente era muito próximo ao do ITZ (**Figura 42A-C**), como relatado em outros estudos (STAN *et al.*, 2016). Assim, foi necessário trabalhar a polaridade da fase móvel, variando a proporção entre a água e acetonitrila. Como pode ser observado na **Figura 42D**, ao utilizarmos uma fase móvel ACN: água (60:40), foi possível separar os componentes e analisar o ITZ (pico em torno de 16,45 minutos), sem interferência dos outros componentes ou diluentes das formulações, como pode ser observado nos cromatogramas das soluções padrão (**Figura 42E-F**). Assim, demonstramos que o método proposto apresentava seletividade e poderia ser utilizado para quantificação tanto de soluções padrão de ITZ quanto do ITZ nas formulações desenvolvidas.

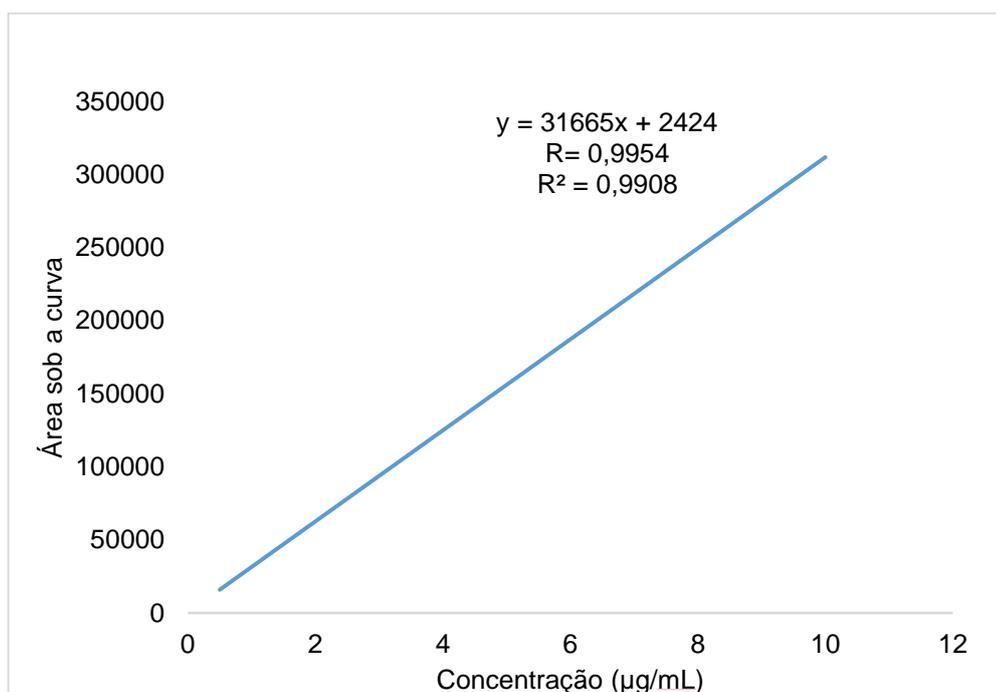


**Figura 42:** Cromatogramas obtidos em diferentes condições de fase móvel, sendo o pico de X3 destacado com seta vermelha e do itraconazol (ITZ) com seta azul. (A) ACN: água (90:10), tempo de corrida: 10 minutos, sobreposição dos picos de X3 e ITZ próximo a 5 minutos; (B) ACN: água (70:30), tempo de corrida: 10 minutos, sobreposição dos picos de X3 e ITZ entre 5 e 6 minutos; (C) ACN:

água (eluição gradiente), tempo de corrida: 20 minutos, sobreposição dos picos de X3 e ITZ entre 18 e 19 minutos com desvio da linha de base; (D) ACN: água (60:40), tempo de corrida: 20 minutos, separação completa do pico de ITZ; (E) formulação polimérica padrão analisada em ACN: água (60:40), tempo de corrida: 20 minutos; (F) formulação oleosa padrão analisada em ACN: água (60:40), tempo de corrida: 20 minutos.

### 5.3.2 Linearidade

Após confirmação da normalidade ( $p > 0,05$ , teste de Shapiro-Wilk) e homocedasticidade ( $c = 0,1961$ , teste de Cochran), a regressão linear foi verificada pelo método de mínimos quadrados ordinários. As curvas foram então analisadas quando à similaridade coeficiente de correlação linear e angular, sendo comprovada a similaridade de ambos os coeficientes e obtida uma curva única ( $Y = 31665X + 2424$ ) (**Figura 43**). Também foi verificado que o coeficiente angular era estatisticamente diferente de zero ( $p < 0,0001$ ) e o linear não estatisticamente diferente de zero ( $p = 0,4853$ ). Os resíduos também apresentaram normalidade ( $p = 0,1807$ , teste de Shapiro-Wilk) e homocedasticidade ( $p = 0,4558$ ). Assim, as 3 curvas obtidas para avaliação do teor de ITZ nas formulações atenderam às premissas necessárias e apresentaram coeficientes de correlação (R) e determinação ( $R^2$ ) satisfatórios, respectivamente 0,9954 e 0,9908. Portanto, a linearidade do método desenvolvido foi comprovada para a faixa de trabalho de 0,5 a 8  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figura 4312:** Curva obtida por regressão linear pelo método de CLAE para análise de itraconazol. Destacam-se a equação e os coeficientes de correlação (R) e determinação ( $R^2$ ).

### 5.3.3 Limites de detecção e quantificação

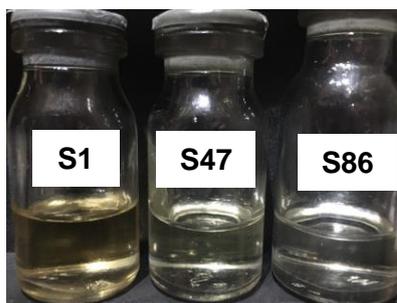
Os limites de detecção e quantificação da curva de linearidade obtida foram, respectivamente, 0,38 µg/mL e 1,15 µg/mL. Assim, a partir do segundo ponto da faixa de trabalho selecionada (2 µg/mL), é possível quantificar o ITZ.

## 5.4 As formulações mais promissoras

No decorrer do estudo foram avaliadas diversas composições com diferentes proporções de excipientes (**ANEXO 1**). Na maioria das formulações observamos precipitação do ITZ logo nos primeiros dias. A partir da análise visual selecionamos 4 formulações como as mais promissoras desenvolvidas ao longo deste estudo: S1, S47, S86 e S108, sendo as três primeiras oleosas e a última polimérica.

### 5.4.1 Formulações oleosas

As formulações oleosas S1, S47 e S86 (**ANEXO 1**) foram produzidas em diferentes datas e apresentaram toque suave e evanescente, sendo rapidamente absorvidas quando aplicadas na pele. Apesar da observação de ITZ precipitado após 1 e 4 dias nas S1 e S47, respectivamente, e separação de fases com formação de precipitado após 30 dias na S86, essas foram formulações oleosas que apresentaram menos ITZ precipitado (**Figura 44**) ao longo dos meses. No entanto, observamos amarelamento em todas essas, sendo mais expressivo na S1.



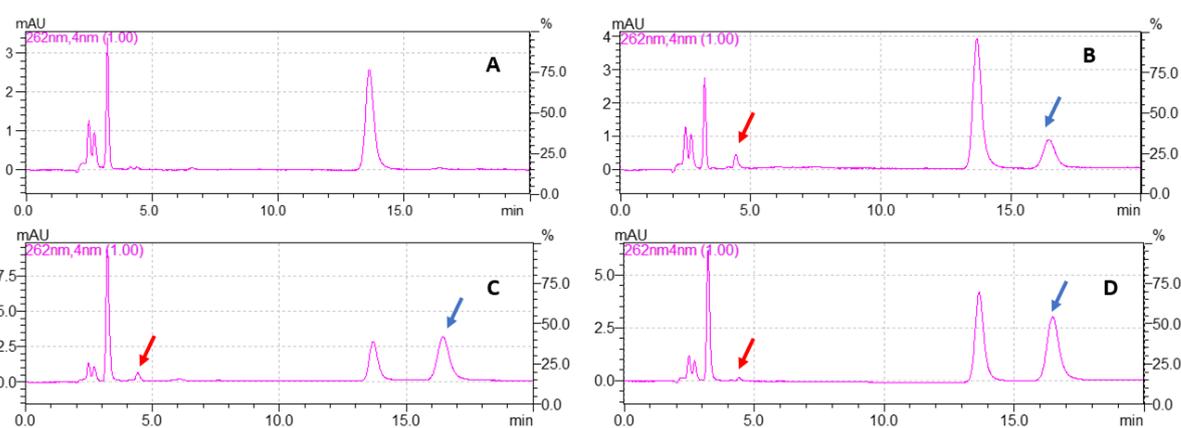
**Figura 44:** Aspecto macroscópico das formulações S1, S47 e S86 após 14, 11 e 7 meses de preparo.

Com o objetivo de obtermos um dado quantitativo do perfil de estabilização do ITZ solubilizado, essas formulações foram submetidas à análise por CLAE. Como pode ser observado na **Tabela 7**, a S47 apresentou o maior percentual de ITZ solubilizado (77,6%, 11 meses), seguida a S86 (74,2%, 7 meses) e da S1 (12,3%, 14 meses).

**Tabela 7:** Caracterização das formulações S1, S47 e S86 após alguns meses de preparo quanto à % de itraconazol solubilizado, espalhabilidade e viscosidade.

Formulação	Tempo decorrido desde seu preparo (meses)	ITZ solubilizado (%)	Espalhabilidade (cm)	Viscosidade (cP)
S1	14	12,3	9,4	23,4
S47	11	77,6	10,3	7,8
S86	7	74,2	7,8	56,2

Analisando os cromatogramas obtidos (**Figura 45**) é visível um pico no tempo de retenção de 4,45 minutos para todas as formulações. Krczyk e colaboradores (2016) também identificaram um pico em tempo de retenção parecido e caracterizaram-no como um produto de degradação do ITZ originado da ruptura da ligação C-N. É interessante observar que o pico do suposto produto de degradação aumenta na medida que a concentração de ITZ diminui, o que pode justificar a baixa concentração de ITZ solubilizado observado na S1, mesmo frente à baixa quantidade de cristais na formulação. É possível ainda que outros produtos de degradação estejam presentes e possam ser observados em tempos de retenção maiores do que o do ITZ, conforme observado por Krczyk e colaboradores (2016); o que poderia explicar a concentração tão baixa para S1. Entretanto, tal investigação não foi realizada no presente estudo.



**Figura 45:** Cromatogramas obtidos para a formulação oleosa sem itraconazol (A) e para as formulações S1 (B), S47 (C) e S86 (D). Em destaque para o pico característico do itraconazol (16,45 minutos, seta azul) e pico sugestivo de produto de degradação (4,45 minutos, seta vermelha).

Com relação à espalhabilidade e viscosidade (**Tabela 7**), como pode ser observado, a S86 apresentou a maior viscosidade (56,2 cP) e menor espalhabilidade (7,8 cm), o que pode ser justificado pela presença de X12 (**ANEXO 1**). Devido ao peso molecular

e às interações de suas cadeias poliméricas, X12 apresenta capacidade de aumentar a densidade e viscosidade do sistema. Esse resultado também pode justificar o maior tempo para aparecimento de precipitado na formulação (30 dias), uma vez que aumenta a resistência da formulação ao fluxo, retardando a sedimentação de cristais. Ao compararmos a viscosidade das formulações S1 e S47 (23,4 e 7,8 cP, respectivamente), percebemos que S1 apresentou-se mais viscosa, o que pode ser explicado pela presença de X7 (**ANEXO 1**), que apresenta densidade entre 0.932–0.945 g/cm<sup>3</sup> a 15,8 °C (ROWE *et al.*, 2009).

#### 5.4.1.1 Planejamento de misturas

A partir da análise das composições e avaliações dos excipientes (Tópico 5.2), propusemos um planejamento experimental de misturas do tipo *simplex lattice*, a fim de avaliarmos a influência dos excipientes X1 e X10 (**Tabela 4**, S114-S121 **ANEXO 1**). Tal tipo de análise tem sido muito empregada na indústria farmacêutica, com o intuito de otimizar a produção de microesferas contendo antimicrobianos (PEÑA *et al.*, 2015), de microemulsões para aplicação tópica (DUANGJIT *et al.*, 2014) e comprimidos (PHADKE *et al.*, 2019).

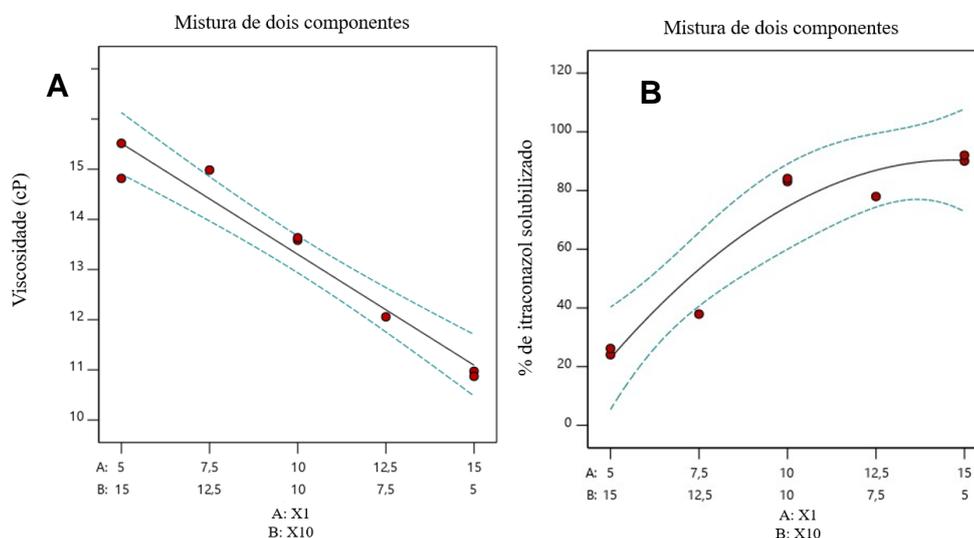
A **Figura 46** ilustra os resultados obtidos para os fatores resposta espalhabilidade e para viscosidade. Como pode ser observado, não é possível identificar diferenças nos valores obtidos para a espalhabilidade ( $p= 0,3100$ ). Este resultado era esperado, posto que X1 e X10 não apresentam adesividade. No entanto, foi observada diferença estatística significativa para a viscosidade ( $p < 0,0001$ ), que é a medida de resistência interna de uma substância ao fluxo quando submetida a uma tensão (SILVA *et al.*, 2019). Para este fator resposta foi observado um aumento linear:  $V= 0,444018.X1 + 0,886399.X10$  ( $R^2= 0,9529$ ), onde V corresponde à viscosidade (cP). O modelo também não apresentou falta de ajuste ( $p= 0,1749$ ).



**Figura 46:** Valores obtidos para os fatores resposta espalhabilidade e viscosidade no planejamento experimental de misturas do tipo simplex lattice.

A **Figura 47** ilustra as curvas obtidas para os fatores resposta viscosidade e % de ITZ solubilizado a partir do planejamento experimental de misturas do tipo *simplex lattice*. Na **Figura 47A** é possível observar claramente o quanto a concentração de X10 impacta na viscosidade das formulações.

Quando avaliamos a **Figura 47B** e **Tabela 8**, observamos que a relação X1:X10 também influenciou na quantidade de % de ITZ solubilizado ( $p < 0,0001$ ). O modelo mais adequado para esta relação foi o quadrático ( $R^2 = 0,9992$ ):  $S = 61,20034.X1 + 60,28896 X10 - 11,31310(X1.X16) + 0,037896 X1.X16.(X1-X16) - 0,041110 (X1-X10)^2$ , onde S corresponde à % de ITZ solubilizado. Segundo o modelo, X1 a 15% p/p (S114 e S119) foi a condição que propiciou os melhores resultados, estando de acordo com as observações feitas anteriormente (Tópico 5.2) e pode ser justificada pela alta solubilidade de ITZ em X1 e pelo fato do ITZ ser mais hidrofóbico do que lipofílico. Assim, a partir destes estudos foi possível solubilizar mais de 90% de ITZ na base oleosa, havendo cerca de 10% de cristais de ITZ em suspensão.



**Figura 47:** Gráficos mostrando as relações obtidas para viscosidade e % de itraconazol solubilizado nas formulações S114-S121, frente à variação nas concentrações de X1 e X10. Em A, observa-se a relação linear para a viscosidade e, em B, a relação quadrática para a % de itraconazol solubilizado.

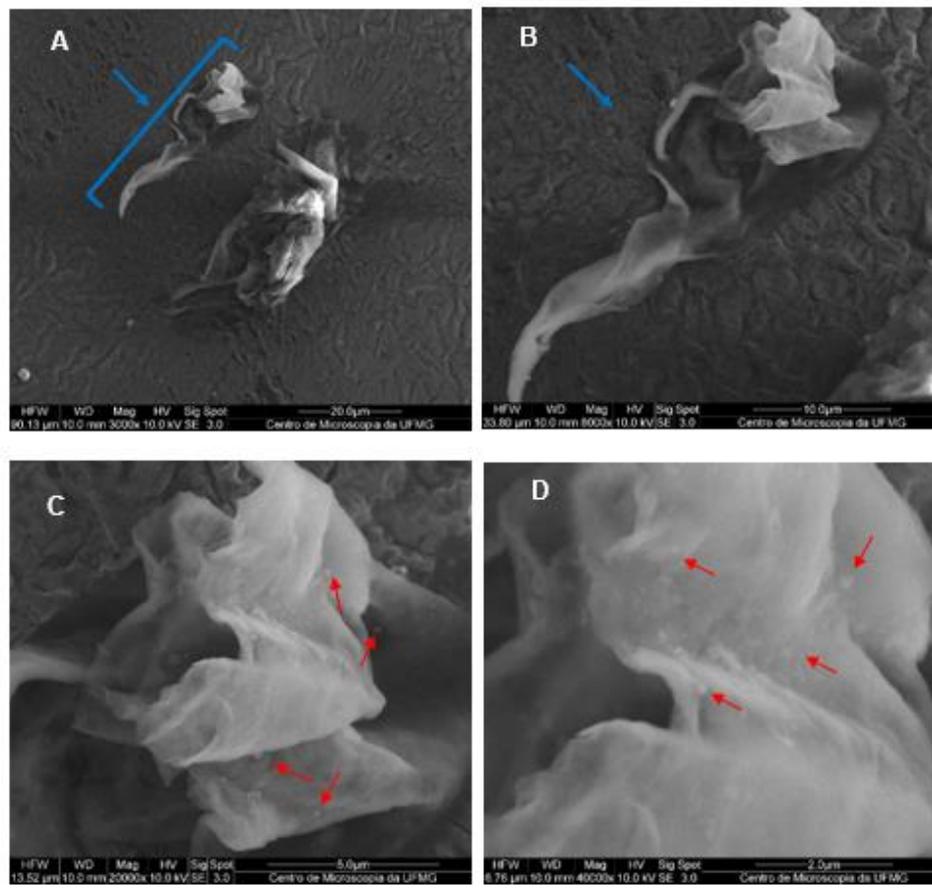
**Tabela 8:** Itraconazol solubilizado (%) nas formulações oleosas obtidas no planejamento experimental de misturas do tipo *simplex lattice*.

Formulação	S114	S115	S116	S117	S118	S119	S120	S121
ITZ solubilizado (%)	92,0283	24,086	83,0586	84,1075	77,9691	90,0674	26,1744	37,9098

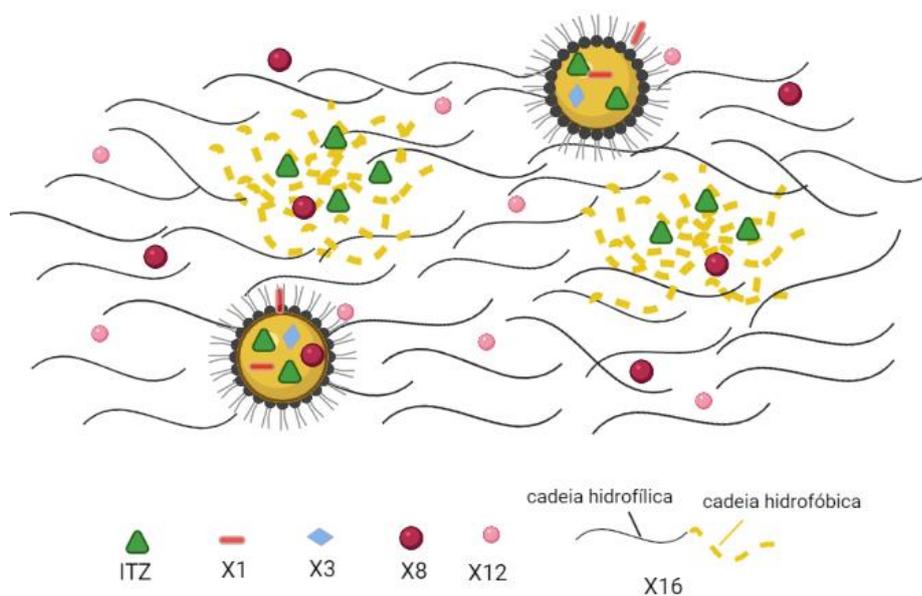
#### 5.4.2 Formulação polimérica

Diante da demanda por uma formulação mais viscosa e mais adesiva, buscamos associar diferentes excipientes ao longo do estudo, conforme já discutido anteriormente. Dentre as formulações poliméricas desenvolvidas, a S108 foi a mais promissora, pois apresentou toque suave e boa adesividade à pele. Também não foi observada a formação de cristais de ITZ na formulação durante a avaliação no microscópio de luz polarizada, sendo visualizadas apenas micropartículas poliméricas, de formatos variados (**Figura 36**).

Com o objetivo de certificarmos a ausência de cristais de ITZ, e visualizarmos as estruturas poliméricas presentes na formulação, a S108 foi analisada por MEV. Como pode ser observado na **Figura 48**, em nenhum campo avaliado foi possível identificar a presença de cristais de ITZ. No entanto, podemos observar uma estrutura enrugada de aspecto enovelado, que provavelmente se formou a partir da retração da rede polimérica após o processo de secagem da amostra (**Figura 48A-B**, seta azul) e pode ser decorrente do rearranjo estrutural do copolímero de bloco de X16, formando estruturas supramoleculares. Quando observamos essas estruturas em um aumento maior, é possível visualizar a presença de micelas esféricas com tamanho médio de  $221 \pm 54$  nm em toda superfície da rede polimérica (**Figura 48C-D**, seta vermelha). Essas micelas podem ser formadas devido à característica anfifílica de X16, favorecendo a interação com excipientes hidrofílicos, como X12 e formando um core lipofílico, onde provavelmente se encontram o ITZ, X1, X3 e X8. Devido às características moleculares, supõe-se que X1, X8 e ITZ possam ser encontrados em ambas as regiões (micelas e estruturas supramoleculares) (**Figura 49**).



**Figura 48:** Imagens da formulação S108 obtida por microscopia eletrônica de varredura (A-D), sendo visível estruturas poliméricas enoveladas (setas e colchetes azuis) com presença de micropartículas poliméricas (setas vermelhas) e ausência de cristais de itraconazol.



**Figura 49:** Ilustração esquemática da interação e organização do itraconazol e excipientes na formulação polimérica S108.

A **Tabela 9** ilustra os resultados obtidos para % de ITZ solubilizado, espalhabilidade e viscosidade. Como pode ser observado, a S108 apresentou alta taxa de ITZ solubilizado e estabilizado no sistema ( $97,3 \pm 2,1$ ). Assim, a adição de excipientes poliméricos com características anfífilas, como o X12 e X16, foi importante na prevenção da precipitação do ITZ, possivelmente devido à formação de uma forte rede polimérica. Importante destacar que a associação desses excipientes propiciou a estabilização do ITZ com uma baixa concentração de X1. Com relação à avaliação da espalhabilidade, a S108 mostrou-se facilmente espalhável, mas com uma resistência maior quando comparada às formulações oleosas. Esta característica atende ao desenho proposto, minimizando o risco da formulação escorrer para os olhos ao ser aplicada na face dos felinos. Espalhabilidade semelhante foi encontrada no desenvolvimento de microemulsão para hidratação de pele seca (SIQUEIRA, 2016).

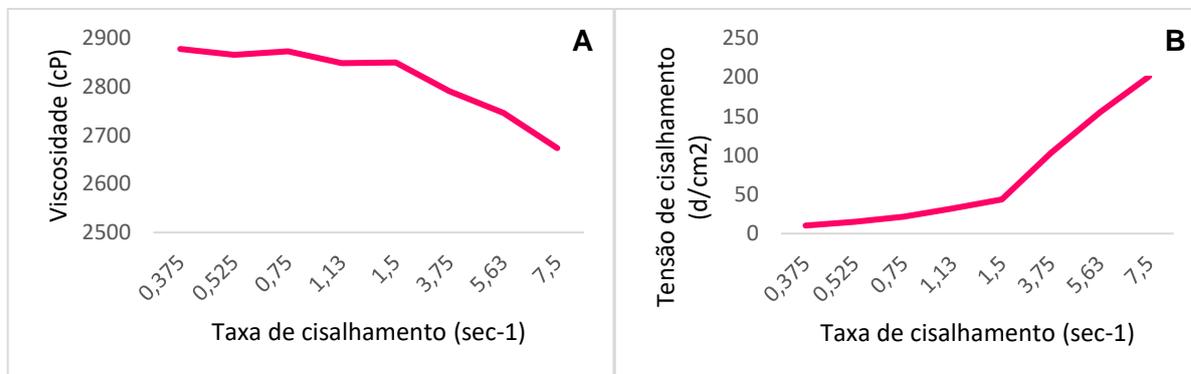
Com relação à viscosidade (**Tabela 9 e Figura 50**), podemos observar um aumento expressivo em relação às formulações oleosas, o que era esperado devido à presença de estruturas coesivas X16 e à hidratação das cadeias de X12. Também é possível observarmos um comportamento característico de fluido pseudoplástico, onde à medida que a taxa de cisalhamento aumenta ocorre uma redução na viscosidade (**Figura 50A**) e aumento na tensão de cisalhamento (**Figura 50B**). Resultado semelhante foi obtido em outro estudo onde foram desenvolvidos géis supramoleculares de X16 e ciclodextrinas para a entrega transdérmica de carvedilol. Este resultado pode ser explicado pela presença de partículas sólidas de X16 que, em repouso, se mantêm em uma estrutura altamente enovelada mas, sob uma tensão (cisalhamento), se orientam na direção do escoamento (COELHO e PINTO, 1998).

**Tabela 9:** Caracterização da formulação S108 (n=3, média  $\pm$  desvio-padrão) para a % de itraconazol precipitado, espalhabilidade (cm) e viscosidade (cP)

% de ITZ solubilizado	Espalhabilidade (cm)	Viscosidade (cP)
$97,3 \pm 2,1$	$5,5 \pm 0,06$	$2815 \pm 297$

Diferentemente, em outro estudo, ao avaliarem o comportamento reológico de misturas de X16 e X11, observaram um comportamento de fluido newtoniano, onde não existe variação da viscosidade frente à mudança na taxa de cisalhamento. Uma possível justificativa para esse resultado foi a interação entre X16 e X11, que evitou a gelificação e agregação do polímero. Como na S108 não temos um componente

oleoso como o X11, observamos a formação de estruturas poliméricas no sistema (**Figuras 48 e 49**) e um perfil reológico não Newtoniano.



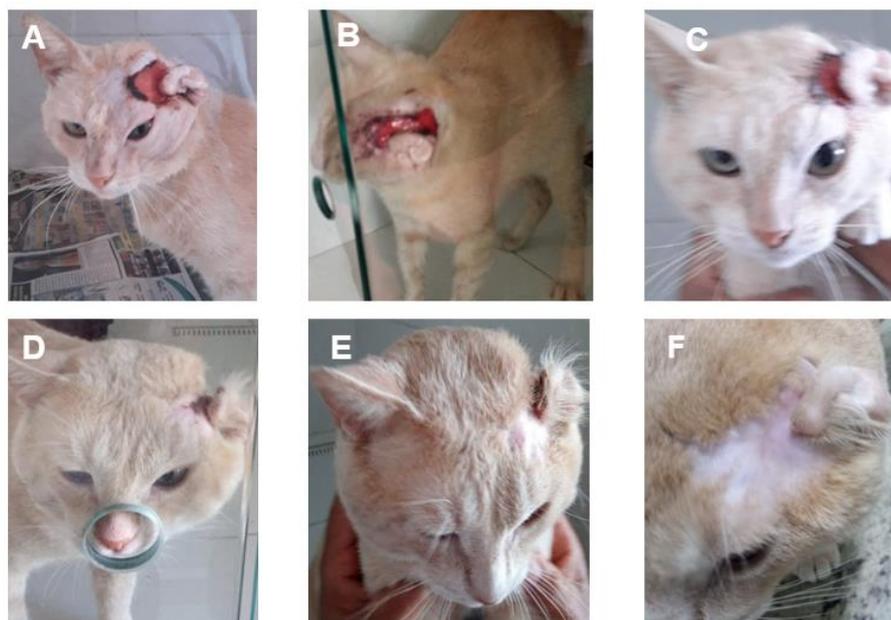
**Figura 50:** Curvas de fluxo da formulação S108 carregada com itraconazol. (A) Viscosidade em função da taxa de cisalhamento e (B) tensão de cisalhamento da taxa de cisalhamento.

## 5.5 Avaliação clínica da eficácia das formulações desenvolvidas em felinos infectados com esporotricose

### 5.5.1 Piloto 1

Após o início do tratamento com a formulação tópica carregada com ITZ, o animal apresentou melhora expressiva da aparência da lesão (**Figura 51A**). A cicatrização foi progressiva nas semanas seguintes (**Figura 51B-F**) e, após 111 dias de aplicação da formulação tópica, houve a cicatrização completa da lesão.

A eficácia do ITZ no tratamento da esporotricose felina é bem relatada, sendo este o medicamento de primeira escolha (GREMIÃO *et al.*, 2020). No entanto, como há no mercado somente formulações orais, a administração sistêmica pode levar à necessidade de descontinuidade do tratamento devido às reações adversas. No estudo piloto, após alguns meses de tratamento com ITZ oral, o animal apresentou alteração em marcadores hepáticos, que pode ter sido causada pelo uso contínuo do ITZ, uma vez que a hepatotoxicidade é uma reação adversa bem descrita com o uso contínuo de ITZ (LOU *et al.*, 2011). Assim, a formulação tópica permitiu otimizar o tratamento, fornecendo uma evidência de eficácia no tratamento de lesões causadas por *Sporothrix* spp. Além disso, ela pode ser também uma alternativa para tratamento de gatos com alterações hepáticas, apresentando boas perspectivas.



**Figura 51:** Evolução clínica do animal tratado com o ITZ tópico. (A) Lesão com bordas indicando processo de cicatrização após 12 dias de tratamento; (B) diminuição da extensão da lesão e processo de cicatrização após 18 dias de tratamento; (C) processo de cicatrização após 25 dias de tratamento; (D) processo de cicatrização após 74 dias de tratamento; (E) fechamento quase completo da lesão após 95 dias de tratamento; (F) lesão fechada e cicatrizada após 111 dias de tratamento.

Fonte: acervo pessoal/ Lincoln, 2021

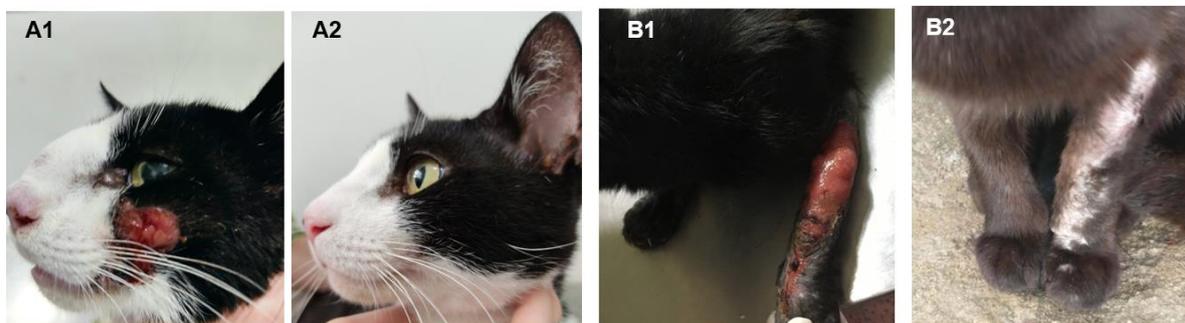
Importante ressaltar que, apesar de existir na literatura estudos de desenvolvimento de novas formulações tópicas carregadas com ITZ (KIM *et al.*, 2017; PASSOS *et al.*, 2020), não foi encontrado nenhum estudo que tenha avaliado a aplicação tópica em gatos contaminados com esporotricose. Em um estudo conduzido por Cutsem (1989), a administração de ITZ tópico, solubilizado em uma mistura de PEG1500 e PEG400, foi avaliada no tratamento de dermatofitoses e infecções causadas por leveduras utilizando diferentes modelos animais. Os resultados foram promissores.

A partir dos resultados obtidos neste estudo, um estudo com um maior número de animais foi conduzido e é apresentado na sequência.

### 5.5.2 Estudo clínico em felinos

As mudanças sugeridas para adequação da formulação quanto à necessidade dos animais, de acordo com o tipo de lesão foram atendidas satisfatoriamente. Na **Figura 52** mostramos a evolução clínica de 2 animais envolvidos no estudo, com diferentes tipos de lesão, que utilizaram a formulação tópica polimérica de ITZ associada ao ITZ

oral. Como é possível observar, a formulação tópica propiciou o tratamento de lesões de diferentes extensões e localizações, sem que nenhum relato de intoxicação fosse feito por parte dos tutores.



**Figura 52:** Evolução clínica de dois gatos (A e B) diagnosticados com esporotricose, tratados com a formulação tópica de itraconazol. Destaque para a melhora do aspecto da lesão facial (A2) e melhora da extensa lesão em pata dianteira esquerda (B2).

A **Tabela 10** apresenta a estatística descritiva resultante da avaliação do tratamento de felinos infectados com esporotricose e tratados com o ITZ oral associado ou não ao tratamento tópico. Como pode ser observado, não houve associação estatisticamente significativa entre cura e o tipo de tratamento e entre óbitos e o tipo de tratamento. A ausência de diferenças estatísticas pode ser decorrente do fato do número de animais entre os dois grupos ser muito diferente, o que dificultou a análise. No entanto, é possível observar um índice de óbito maior no grupo dos animais tratados somente com a formulação oral (21,31%) em comparação com os animais onde foi feita a associação com a formulação tópica (5,26%). Nossas análises também demonstraram que não houve associação do sexo do animal com a cura ( $p=0,650$ ) nem associação de sexo do animal com o uso do medicamento tópico ( $p= 0,285$ ), demonstrando que tanto machos quanto fêmeas podem se beneficiar do tratamento da mesma forma.

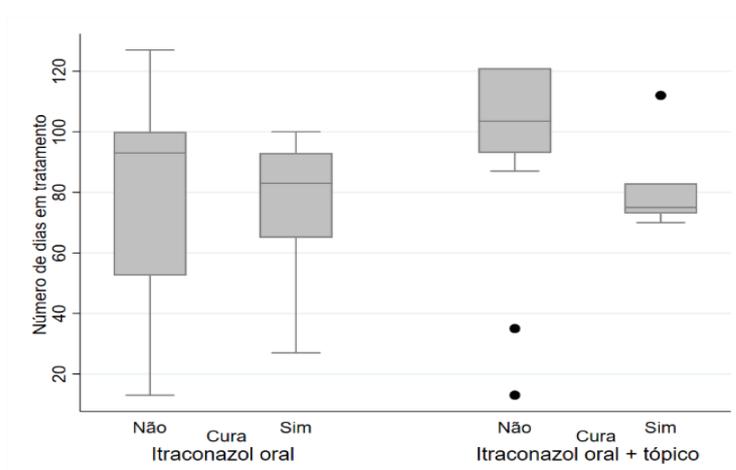
A **Figura 53** ilustra a distribuição do tempo de tratamento de acordo com o tipo de tratamento (oral ou oral + tópico) e a cura. Como pode ser observado, nos animais do grupo tratado somente com ITZ oral foi observada uma grande dispersão no tempo de tratamento, não havendo diferença estatística no tempo entre os animais curados e não curados. Já no grupo dos animais tratados com o ITZ oral associado ao tópico, o tempo de tratamento foi estatisticamente menor entre os animais curados. Na comparação do tempo de tratamento entre os animais curados nos dois tratamentos, o tempo de tratamento foi estatisticamente menor ( $p<0,05$ ) no grupo de ITZ oral

associado ao tópico. Esses resultados nos mostram quão positiva foi a associação da formulação tópica, uma vez que o fármaco foi entregue em quantidade adequada no sítio de infecção (FEDERICO *et al.*, 2017), propiciando uma redução no tempo de tratamento.

A redução do tempo de tratamento pode aumentar a adesão, visto ser o tratamento longo uma das principais causas de abandono (LLORET *et al.*, 2013; GREMIÃO *et al.*, 2020). Este resultado também pode ajudar a explicar o menor índice de óbitos observado no grupo de animais tratados com a associação. Com a redução do tempo de tratamento, o animal fica menos susceptível a desenvolver reações adversas graves ao ITZ, que podem comprometer sua sobrevivência.

**Tabela 10:** Avaliação dos índices de cura e óbitos resultantes do tratamento de felinos infectados com esporotricose e tratados com o itraconazol oral associado ou não ao tratamento tópico.

Categorias	Itraconazol oral apenas				Itraconazol oral + tópico				
	n	%	Média	Mediana	n	%	Média	Mediana	
Cura	Não	44	72.13%	77.84	93.00	14	73.68%	95.21	103.50
	Sim	17	27.87%	73.53	83.00	5	26.32%	82.60	75.00
Óbito	Não	48	78.69%	83.75	93.00	18	94.74%	95.06	6.50
	Sim	13	21.31%	50.38	50.00	1	5.26%	35.00	35.00
<b>Geral</b>		61	61,00%	73,63	93,00	19	19,00%	91,89	93,00



**Figura 53:** Perfil de distribuição do tempo de tratamento de acordo com o tipo de tratamento (oral ou oral + tópico) e a cura.

## 6 CONCLUSÃO

A partir dos estudos de pré-formulação e desenvolvimento foi possível avaliar os excipientes que mais impactavam na solubilização e estabilização do ITZ nas formulações. No planejamento experimental de misturas do tipo *simplex lattice*, ratificamos a importância do X1 para a solubilização do ITZ nas formulações oleosas, confirmando que o ITZ é mais um fármaco mais hidrofóbico do que lipofílico. Assim, foi possível obter formulações oleosas com aproximadamente 90% de ITZ solubilizado e 10% de ITZ em suspensão. A observação das características anfífilas do fármaco viabilizou também a obtenção de uma formulação polimérica de maior viscosidade, permitindo o tratamento de lesões faciais com pequeno risco de escorrer e atingir os olhos dos felinos. Na formulação polimérica a presença do X16 se mostrou essencial, sendo possível obter aproximadamente 100% de solubilização e estabilização do ITZ, não sendo visível cristais do fármaco em nenhuma das técnicas microscópicas utilizadas (luz polarizada e MEV). O método analítico desenvolvido (CLAE) mostrou-se adequado para a quantificação do ITZ, tanto nas formulações poliméricas quanto nas oleosas, apresentando seletividade e linearidade. Por fim, através dos estudos clínicos conduzidos nos felinos infectados com esporotricose, foi possível observar que a associação do ITZ tópico propiciou um aumento na eficácia, diminuindo o tempo de tratamento, o que diminui o custo e o risco de reações adversas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRANTES, C. G. *et al.* An Overview of Pharmaceutical Excipients: Safe or Not Safe? *J Pharm Sci*, 105: 2019-2026, 2006.
- AHMAD, N. *et al.* Poloxamer-Chitosan-based Naringenin nanoformulation used in brain targeting for the treatment of Cerebral Ischemia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27 (1), 2020.
- ALBERTI, I., *et al.* Effect of ethanol and isopropyl myristate on the availability of topical terbinafine in human stratum corneum, in vivo. *International Journal of Pharmaceutics*, 219(1-2), 2001
- ALBUQUERQUE, A.N. Desenvolvimento farmacêutico para o tratamento de alopecia. 2018. 99f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Química da Faculdade de Ciências e Tecnologias). Lisboa, Portugal.
- ALHOWYAN, A.A. *et al.* Antifungal efficacy of Itraconazole loaded PLGA-nanoparticles stabilized by vitamin-E TPGS: In vitro and ex vivo studies. *Journal of Microbiological Methods*, 16, 87-95, 2019. doi:10.1016/j.mimet.2019.01.020
- ALLEN, L.V.; POPOVICH, N.G.; ANSEL, H.C. Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos. 9 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.
- ALMEIDA-PAES R, *et al.*. Melanins protect *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii* from the antifungal effects of terbinafine. *PLoS One*. 2016;11:e0152796.
- ALMEIDA-PAES R. Fatores de virulência e antígenos de *Sporothrix* spp. relacionados à endemia de esporotricose no estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. Tese [Doutorado em Biologia Celular e Molecular] - Instituto Oswaldo Cruz; 2012.
- ALZUGUIR, C.L.C.; *et al.* Geo-epidemiology and socioeconomic aspects of human sporotrichosis in the municipality of Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil, between 2007 and 2016. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 00, 1-8, 2019. doi:10.1093/trstmh/trz081
- APTE, S.P., UGWU, S.O. 2003. Emerging excipients in parenteral medications. *Pharm Technol*, 3: 46-60, 2003.
- ARAÚJO, L.A. Desenvolvimento de formulações cosméticas contendo óleos vegetais para a proteção e reparação capilar. Dissertação de mestrado. USP, Ribeirão Preto, 90p., 2015.
- ARICÒ, F., & TUNDO, P. Isosorbide and dimethyl carbonate: a green match. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, v.12, 2256–2266, 2016.
- ARICÒ, F.; *et al.*. One-Pot Preparation of Dimethyl Isosorbide from D -Sorbitol via Dimethyl Carbonate Chemistry. *ChemSusChem*, 10(1), 53–57, 2017.
- AZEEM, A.; AHMAD, F.J.; KHAR, R.K.; TALEGAONKAR, S. Nanocarrier for the transdermal delivery of antiparkinsonian drug. *AAPS PharmSciTech*, 10(4), 1093-1103, 2009.
- BARRETT, A.M.; DEGHANI, F.; FOSTER, N.R. Increasing the Dissolution Rate of Itraconazole Processed by Gas Antisolvent Techniques using Polyethylene Glycol as a Carrier, *Pharmaceutical Research*, 25(6), 1274–1289, 2008.

- BARROS, M.B.L. *et al.* Esporotricose: a evolução e os desafios de uma epidemia. *Revista Panamericana de Salud Publica*. v. 27, n. 6, p. 455-460, 2010.
- BARROS, M.B.L.; *et al.* Treatment of Cutaneous Sporotrichosis with Itraconazole- Study of 645 Patients. *Clinical Infectious Diseases*, v. 52, n. 12, p.200-206, 2011b.
- BARROS, M.B.L.; PAES, R.A.; SCHUBACH, A.O. Sporothrix schenckii and Sporotrichosis. *Clinical Microbiology Reviews*, p.633-654, 2011a.
- BASF. Kollicream Grade and Kollisolv MCT Grades Technical information. 03\_111144e-02, p. 1-8, 2013.
- BASF. Soluplus Technical Information. 03\_090801e-05. 1-8, 2015.
- BENITO-PEÑA, E. *et al.* Experimental Mixture Design as a Tool for the Synthesis of Antimicrobial Selective Molecularly Imprinted Monodisperse Microbeads. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7(20), 10966–10976, 2015. doi:10.1021/acsami.5b02238
- BERALDO-DE-ARAÚJO, V. L. *et al.* Excipient-excipient interactions in the development of nanocarriers: an innovative statistical approach for formulation decisions. *Scientific Reports*, 9(1), 2019.
- BERTHELSEN, R. *et al.* Kolliphor Surfactants Affect Solubilization and Bioavailability of Fenofibrate. Studies of in Vitro Digestion and Absorption in Rats. *Molecular Pharmaceutics*, 12(4), 1062–1071, 2015. doi:10.1021/mp500545k
- BIAN, X. *et al.* Development of PLGA-based itraconazole injectable nanospheres for sustained release. *International Journal of Nanomedicine*. v. 8, p. 4521-4531, 2013.
- BIELE, M. *et al.* Efficacy and tolerability of a new synergized pyrethrins thermofobic foam in comparison with benzyl benzoate in the treatment of scabies in convicts: the ISAC study (Studio Della scabbia in ambiente carcerario). *European Academy of Dermatology and Veneorology*. v.20, p. 717-720, 2006.
- BONENGEL, S. *et al.* Impact of different hydrophobic ion pairs of octreotide on its oral bioavailability in pigs. *Journal of Controlled Release*, 273, 21–29, 2018. doi:10.1016/j.jconrel.2018.01.012
- BONGOMIN, F. *et al.* Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. *Journal of Fungi*, 3(4), 57, 2017. doi:10.3390/jof3040057
- BORBA, H.H.L.; *et al.* Cost-effectiveness of amphotericin B formulations in the treatment of systemic fungal infections. *Mycoses*, 2018. <10.1111/myc.12801>
- BRASIL. FARMACOPEIA Brasileira, 6a ed. v. 1. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2019. 873 p.
- BRASIL. **Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2a edição, revista – Brasília: ANVISA, 2008.
- BRASIL. Portaria Nº 264, de 17 de fevereiro de 2020. Altera a Portaria de Consolidação nº 4/GM/MS, de 28 de setembro de 2017, para incluir a doença de Chagas crônica, na Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos

serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional. Órgão emissor: Ministério da Saúde. Disponível em: [https://bvsmis.saude.gov.br/bvsmis/saudelegis/gm/2020/prt0264\\_19\\_02\\_2020.html](https://bvsmis.saude.gov.br/bvsmis/saudelegis/gm/2020/prt0264_19_02_2020.html), acesso em 23 de março de 2021.

BRASIL. **Resolução da diretoria colegiada n° 166, de 24 de julho de 2017**. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 141a edição. 87p. Brasília: ANVISA, 2017

BUYA, A.B. *et al.* Self-Nano-Emulsifying Drug-Delivery Systems: From the Development to the Current Applications and Challenges in Oral Drug Delivery. *Pharmaceutics*. 12, 1194, 2020.

CARDOSO, C.R.; *et al.*. Influence of topical administration of n-3 and n-6 essential and n-9 nonessential fatty acids on the healing of cutaneous wounds. *Wound Repair Regen*. 12, 235–243, 2004.

CHAKRABARTI, A.; *et al.* Global epidemiology of sporotrichosis. *Medical Mycology*, 53(1), 3–14, 2015. doi:10.1093/mmy/myu062

CHEN, C.Y. *et al.* Luteolin suppresses inflammation-associated gene expression by blocking NF-kappaB and AP-1 activation pathway in mouse alveolar macrophages. *Life Sci*. 81, 1602–1614, 2007.

CHEN, W., *et al.* Development and evaluation of novel itraconazole-loaded intravenous nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 362, n.1-2, p.133–140, 2008.

CHIU, H.Y. *et al.* Risk of Psoriasis Following Terbinafine or Itraconazole Treatment for Onychomycosis: A Population-Based Case-Control Comparative Study. *Drug Saf*. 41, 285-295, 2018.

COELHO, P.M.; PINHO, F.T. Comportamento reológico de algumas soluções aquosas diluídas em polímeros. *Publicações do Departamento de Engenharia Mecânica e Gestão Industrial Faculdade de Engenharia*, Portugal, 10p., 1998.

COSMETIC INGREDIENT REVIEW (CIR). Safety Assessment of Polyglyceryl Fatty Acid Esters as Used in Cosmetics. Washington, DC. P. 1-90, 2016.

CROSS, L.J., BAGG, J., AITCHISON, T.C. Efficacy of the cyclodextrin liquid preparation of itraconazole in treatment of denture stomatitis: comparison with itraconazole capsules. *Antimicrob Agents Chemother*. 44, 425-427, 2000.

CUTSEM, J.V. Oral, Topical and Parenteral Antifungal Treatment with Itraconazole in Normal and in Immunocompromised Animals. *Mycosis*, 32(Supplement s1), 14–34, 1989. . doi:10.1111/j.1439-0507.1989.tb02291.x

DAR, A.A.; ARUMUGAM, N. Lignans of sesame: Purification methods, biological activities and biosynthesis—A review. *Bioorg. Chem*. 50, 1–10, 2013.

DE SOUZA, E.W. *et al.* 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.

- DESHPANDE, T.M. *et al.* Investigation of polymer-surfactant interactions and their impact on Itraconazole solubility and precipitation kinetics for developing spray dried amorphous solid dispersions. *Molecular Pharmaceutics*, 2018. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.7b00902
- DONCKER, P. *et al.* Itraconazole: What clinicians should know?, *Indian J Drugs Dermatol* 3:4-10; 2017.
- DOS SANTOS, R.G.M. Sistemas autoemulsificantes: uma alternativa viável para a veiculação de fármacos pouco solúveis em água. Monografia (especialização) – Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos, Pós-graduação em Tecnologias Industriais Farmacêuticas, 85p, Rio de Janeiro, 2013.
- DUANGIT, S. *et al.* Role of Simplex Lattice Statistical Design in the Formulation and Optimization of Microemulsions for Transdermal Delivery. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 37(12), 1948–1957, 2014. doi:10.1248/bpb.b14-00549
- DUMORTIER, G. *et al.* A Review of Poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics. *Pharmaceutical Research*, 23(12), 2709–2728, 2006.
- ELEFThERIADIS, G.K. *et al.* Development and characterization of a Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System Comprised of Rice Bran Oil for Poorly Soluble Drugs. *AAPS PharmSciTech*, 20(2), 2019. doi:10.1208/s12249-018-1274-y
- EL-SHERIDY, N.N. *et al.* Itraconazole lipid nanocapsules gel for dermatological applications: characteristics and treatment of induced cutaneous candidiasis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. v. 181, p. 623-631, 2019.
- EPSHTEIN, N. A. System Suitability Requirements for Liquid Chromatography Methods: Controlled Parameters and their Recommended Values. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, v. 54, n. 5, p. 518-525, 2020.
- FAKHREE, M.A.A. *et al.* The Importance of Dielectric Constant for Drug Solubility Prediction in Binary Solvent Mixtures: Electrolytes and Zwitterions in Water + Ethanol. *AAPS PharmSciTech*, 11(4), 1726–1729, 2010.
- FEDERICO, M. P. *et al.* Notions of pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters, and their use in medical practice. *Rev Soc Bras Clin Med*. 15(3): 201-5, 2017.
- FERNANDES, B. *et al.* A case of disseminated sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis*. *Medical mycology: case reports*, v. 21, p.34-36, 2018
- FERREIRA, C.S. Descrição de aspectos clínicos e laboratoriais de pacientes com esporotricose e leishmaniose tegumentar americana, com ênfase em mulheres grávidas. 2016. 97f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas) Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- FERREIRA, P. *et al.* Investigation of a microemulsion containing clotrimazole and itraconazole for transdermal delivery for the treatment of sporotrichosis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2019.

- FERREIRA, P.G. *et al.* Development of a Method for the Quantification of Clotrimazole and Itraconazole and Study of Their Stability in a New Microemulsion for the Treatment of Sporotrichosis. *Molecules*, v. 24, n. 12, p. 2333, 2019.
- FICHMAN, V. *et al.* Cryosurgery for the treatment of cutaneous sporotrichosis: experience with 199 cases. *British Journal of Dermatology*, 2019.
- FRANCOIS, M. *et al.* A mucoadhesive, cyclodextrin-based vaginal cream formulation of itraconazole. *AAPS PharmSci.* 5 (1), 2005.
- FRIEDMAN, D.Z.P.; SCHWARTZ, I.S. Emerging Fungal Infections: New Patients, New Patterns, and New Pathogens. *J. Fungi*, 5, 67, 2019.
- FUNG, S.L., CHAU, C.H., TEIXO, W.W. Cardiovascular adverse effects during itraconazole therapy. *European Respiratory Journal.* 32, 240, 2008.
- GAFFI. Global Fund for Fungal Infections. 2021. Disponível em: < <https://www.gaffi.org/>>, acesso em 22 mar 2021.
- GIACOMAZZI, J. *et al.* The burden of serious human fungal infections in Brazil. *Mycoses*, 2015. <doi:10.1111/myc.12427>
- GIBSON, M. Pharmaceutical preformulation and formulation: A practical guide from candidate drug selection to commercial dosage form. v. 199, 2ed, New York: *Informa Healthcare*, 2009.
- GIGLIOBIANCO, M.R. *et al.* Nanocrystals of Poorly Soluble Drugs: Drug Bioavailability and Physicochemical Stability. *Pharmaceutics*, 10, 134, 2018.
- GREMIÃO, I. D. F. *et al.* Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: Cat to Human Transmission. *PLOS Pathogens*, 13(1), 2017.
- GREMIÃO, I.D.F. *et al.* Geographic Expansion of Sporotrichosis, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 26(3), 621–624, 2020. doi:10.3201/eid2603.190803
- GREMIÃO, I.D.F. *et al.* Feline sporotrichosis: epidemiological and clinical aspects. *Medical Mycology*. v.53, n.1, p.15-21, 2015. <https://doi.org/10.1093/mmy/myu061>
- GREMIÃO, M.P.D.; CASTRO, A.D. Considerações sobre o processo de dissolução na preparação de dispersões moleculares. *Infarma*, 9(1/5), 1999.
- HARDIN, T.C. *et al.* Pharmacokinetics of itraconazole following oral administration to normal volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32, 1310-1313, 1988
- HE, D. *et al.* Transcriptome Analysis of Dimorphic Fungus *Sporothrix schenckii* Exposed to Temperature Stress. *International Microbiology*, v. 24, p. 25-35, 2021. doi:10.1007/s10123-020-00136-y
- HERMAN, A., & HERMAN, A. P. Essential oils and their constituents as skin penetration enhancer for transdermal drug delivery: a review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 67(4), 473–485, 2014.
- HIRUMA, M; KAGAWA, S. Ultrastructure of *Sporothrix schenckii* treated with iodine-potassium solution. *Mycopathologia*. v.97: p.121-127, 1987.

- HITCHCOCK, C.A., *et al.* Interaction of azole antifungal antibiotics with cytochrome P-450-dependent 14 alpha-sterol demethylase purified from *Candida albicans*. *Biochem J.* 266, 475-480, 1990.
- HOFFMANN, W.J., MCHARDY, I., THOMPSON III, G.R., Itraconazole induced hypertension and hypokalemia: Mechanistic evaluation. *Mycoses.* 61, 337-339, 2018.
- HOU, J.; SUN, E.; SUN, C. Improved oral bioavailability and anticancer efficacy on breast cancer of paclitaxel via Novel SoluplusVR—SolutolVR HS15 binary mixed micelles system. *Int J Pharm.* 512:186–193, 2016.
- HUGO, C.P.; ROCHA, R.D.R.; FERREIRA, M.F.R. Esporotricose humana: aspectos clínicos, laboratoriais e caso clínico. *Pós em revista.* P.217-222, 2013.
- ISHAM. International Society for Human and Animal Mycology. 2021. Disponível em < <http://life-worldwide.org/media-centre/article/epidemiological-cut-off-values-ecvs-for-species-of-sporothrix-a-step-to-def>>, acesso em 23 de março de 2021.
- KALAM, M.A. *et al.* Solid liquid equilibrium of an antifungal drug itraconazole in different neat solvents: Determination and correlation. *Journal of Molecular Liquids*, 234, 81–87, 2017. doi:10.1016/j.molliq.2017.03.054
- KAUFFMAN, C.A. *et al.* Clinical Practice Guidelines for the Management of Sporotrichosis: 2007 Update by Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases.*, v.45, p.1255-1265, 2007.
- KEARNEY, M. C.L *et al.* Design and Development of Liquid Drug Reservoirs for Microneedle Delivery of Poorly Soluble Drug Molecules. *Pharmaceutics*, 11(11), 2019.
- KIM, H. *et al.* Characteristics of Skin Deposition of Itraconazole Solubilized in Cream Formulation. *Pharmaceutics*, 11(4), 195, 2019.
- KIM, J.-K., PARK, J.-S., & KIM, C.-K. Development of a binary lipid nanoparticles formulation of itraconazole for parenteral administration and controlled release. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 383, n.1-2, p. 209–215, 2010
- KOO, O.M.Y. Application challenges and examples of new excipients in advanced drug delivery systems. *Am. Pharm. Rev.*, 14: 60–68, 2011.
- KRYCZYK, A.; ŻMUDZKI, P.; HUBICKA, U. Determination of itraconazole and its photodegradation products with kinetic evaluation by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, 2016k. doi:10.1002/bmc.3747
- LACAZ, C.S. *et al.* Tratado de Micologia médica; Prefácio: Bertrand Dupont. 9. ed. São Paulo, Sarvier, 1104p, 2002.
- LACAZ, C.S. Guia para identificação: fungos actinomicetos e algas de interesse médico. São Paulo, Savier, 1998.

- LECCA, L. O. *et al.* Associated factors and spatial patterns of the epidemic sporotrichosis in a high density human populated area: A cross-sectional study from 2016 to 2018. *Preventive Veterinary Medicine*, 104939, 2020.
- LEMARIÉ, F. *et al.* Revisiting the metabolism and physiological functions of caprylic acid (C8:0) with special focus on ghrelin octanoylation. *Biochimie*, 120, 40–48, 2016.
- LI, L.; ZHOU, C.H.; XU, Z.P. Self-Nanoemulsifying Drug-Delivery System. *Nanocarriers for Drug Delivery*; p. 421–449, 2019.
- LI, M. *et al.* Silk-coated dexamethasone non-spherical microcrystals for local drug delivery to inner ear, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* v. 150, 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105336>
- LI, S. *et al.* Itraconazole-loaded micelles based on linear-dendritic poly (ethylene glycol)-b-poly ( $\epsilon$ -caprolactone). *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 1–23, 2018.
- LIEBERT, M.A. Final report on the safety assessment of myristyl myristate and isopropyl myristate. *Journal of the American College of Toxicology*. v.1, n.4, 1982.
- LIM, W. *et al.* Formulation and delivery of itraconazole to the brain using a nanolipid carrier system. *International Journal of Nanomedicine*, v.9, p. 2117-2126, 2014. doi:10.2147/IJN.S57565
- LIN, T.K.; ZHONG, L.; SANTIAGO, J. Anti-Inflammatory and Skin Barrier Repair Effects of Topical Application of Some Plant Oils. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 2018. doi:10.3390/ijms19010070
- LLORET, A. *et al.* Sporotrichosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 15(7), 619–623, 2013. doi:10.1177/1098612X13489225
- LOCKHART, S.R.; GUARNER, J. Emerging and reemerging fungal infections. *Seminars in Diagnostic Pathology*, v.36, p.177-181, 2019.
- LOPES-BEZERRA, L.; SCHUBACH, A.; ROSANE-COSTA, O. Sporothrix schenckii and Sporotrichosis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*., v.78, p.293-308, 2006.
- LOU, D., *et al.* Improved thermal conductivity of PEG-based fluids using hydrogen bonding and long chain of nanoparticle. *J Nanopart Res* 23, 98, 2021.
- LOU, H.Y. *et al.* Hepatic failure related to itraconazole use successfully treated by corticosteroids. *Hepat Mon*. v. 11, p. 843-846, 2011.
- MAHAJAN, V.K. Sporotrichosis: An overview and therapeutic options. *Dermatology Research and Practice*. 13 p., 2014.
- MALAQUIAS, L.F.B. Desenvolvimento de sistemas de liberação modificada de antifúngicos orais por termoextrusão. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília. Brasília, 2017.

- MALI, K.K.; DHAWALE, S.C.; DIAS, R.J. Microemulsion based bioadhesive gel of itraconazole using tamarind gum: *in vitro* and *ex vivo* evaluation. *Marmara Pharmaceutical Journal*. v. 21, n. 3, p. 688-700, 2017.
- 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.
- MARTINELLO, V.C.A. Comparação de perfis de dissolução de cápsulas contendo itraconazol. Universidade de São Paulo. Dissertação de mestrado, 69p, São Paulo, 2007.
- MARTINEZ-ROSSI, N. M.; PERES, N.T.A.; ROSSI, A. Pathogenesis of Dermatophytosis: Sensing the Host Tissue. *Mycopathologia*, 182, 1-2, p. 215–227, 2017.
- MATOWANE, R.G. *et al.* In silico analysis of cytochrome P450 monooxygenases in chronic granulomatous infectious fungus *Sporothrix schenckii*: Special focus on CYP51. *Bbapap*, v. 1866 (1), p166-177, 2017. doi:10.1016/j.bbapap.2017.10.003
- MATSUURA, K. *et al.* Preparation and characterization of Itraconazole-or Miconazole-loaded PLGA microspheres. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 67, n. 2, p. 106-111, 2019.
- MEDAREVIC, D. *et al.* Combined application of mixture experimental design and artificial neural networks in the solid dispersion development, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, p. 1-14, 2015. DOI: 10.3109/03639045.2015.1054831
- MERCER, E.I. Inhibition of sterol 14 alpha-demethylase enzymes. *Biochem Soc Trans.* v.11, p. 663-665, 1983.
- MINAS GERAIS. Secretaria de Estado de Saúde. Resolução SES/MG Nº 6.532, de 05 de dezembro de 2018: Acrescenta Doenças, Agravos e Eventos de Saúde Pública de Interesse Estadual à Lista Nacional de Doenças de Notificação Compulsória e dá outras providências. Belo Horizonte, 2018.
- MIYAKE, K. *et al.* Characterization of itraconazole/2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex in aqueous propylene glycol solution. *Int J Pharm*, v. 179; p.237–45, 1999.
- MONTENEGRO, H. *et al.* Feline sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis*: na emerging infection in São Paulo, Brazil. *BMC Veterinary Research*, v. 269, p. 0264-0269, 2014.
- MORRAL-RUIZ, G. *et al.* Polyurethane and polyurea nanoparticles based on polyoxyethylene castor oil derivative surfactant suitable for endovascular applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 461(1-2), 1–13, 2014.
- NAKASU, C.C.T.L. *et al.* Feline sporotrichosis: a case series of itraconazole-resistant *Sporothrix brasiliensis* infection. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 52 (1); p. 163–171, 2020. doi:10.1007/s42770-020-00290-5
- NASIRI, M.; FARSI, Z. Effect of light pressure stroking massage with sesame (*Sesamum indicum* L.) oil on alleviating acute traumatic limbs pain: A triple-blind controlled trial in emergency department. *Complement. Ther. Med.* v. 32, p. 41–48, 2017.
- NASR, M. *et al.* Novel nicotinamide skin-adhesive hot melt extrudates for treatment of acne. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2018 doi:10.1080/17425247.2018.1546287

- NICOLINO, R. R. *et al.* Spatial association between sporotrichosis in cats and in human during a Brazilian epidemics. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 183, 2020.
- NORONHA, L.L. *et al.* Formulation and Evaluation of a Novel Itraconazole-Clotrimazole Topical Emulgel for the Treatment of Sporotrichosis, *Curr Pharm Des*, 26 (14):1566-1570, 2020.
- NWEZE, E.I; EKE, I.E. Dermatophytes and dermatophytosis in the eastern and southern parts of Africa. *Medical Mycology*, v. 56 (1), p. 13-28, 2017.
- OLARIU, I. *et al.* Development and evaluation of microemulsion-based hydrogel formulations for topical delivery of propranolol hydrochloride. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 10(1), p. 395 – 412, 2014.
- OLIVEIRA, G., HADGRAFT, J., & LANE, M. E. The influence of volatile solvents on transport across model membranes and human skin. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 435, n.1, p.38–49, 2012.
- ONG, G. S. Y. *et al.* Anaphylaxis Triggered by Benzyl Benzoate in a Preparation of Depot Testosterone Undecanoate. *Case Reports in Medicine*, v.5, 2012.
- OROFINO-COSTA, R. *et al.*. Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 92(5), 606–620, 2020. doi:10.1590/abd1806-4841.2017279
- OSBORNE, D.W. .Diethylene glycol monoethyl ether: an emerging solvent in topical dermatology products. *Journal of Cosmetic Dermatology*, v. 10(4), p. 324–329, 2011.
- OSBORNE, D.W.; MUSAKHANIAN, J. Skin Penetration and Permeation Properties of Transcutol®—Neat or Diluted Mixtures. *AAPS SciTech*, v. 19, 3512–3533, 2018.
- PAIVA, M.T. *et al.* Spatial association between sporotrichosis in cats and in human during a Brazilian epidemic. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 183, 2020.
- PASSOS, J.S. *et al.* Development, Skin Targeting And Antifungal Efficacy Of Topical Lipid Nanoparticles Containing Itraconazole. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2020.
- PELTONEN, L.; HIRVONEN, J. Drug nanocrystals – Versatile option for formulation of poorly soluble Materials. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 537, p. 73-83, 2018.
- PEÑA, E.B. *et al.* Experimental Mixture Design as a Tool for the Synthesis of Antimicrobial Selective Molecularly Imprinted Monodisperse Microbeads. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, v. 20 (7), 2015. DOI: 10.1021/acsami.5b02238
- PEREIRA A.S.; PASSOS S.R.; SILVA, J.N. Response to azolic antifungal agents for treating feline sporotrichosis, *Veterinary Record*, v.166, p.290-294, 2010.
- PERMANA, A.D. *et al.* Dissolving microneedle-mediated dermal delivery of itraconazole nanocrystals for improved treatment of cutaneous candidiasis. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 153, 50-61, 2020.
- PETER, J.R; SILVA, R.; ANDRADE, F.C. A esporotricose e seu impacto social. *Vitalle- Revista de Ciências da Saúde*. v.28, p.111-114, 2016.

- PEYTON, L.R.; GALLAGHER, S.; HASHEMZADEH, M. Triazole antifungals: a review. *Drugs of Today*. v.51, n.12, p. 705-718, 2015.
- PHADKE, S. *et al.* Application of simplex lattice design for the development of extended release tablets of model drug diclofenac sodium. *Therapeutic Delivery*, v. 10 (9), 2019. doi:10.4155/tde-2019-0034
- PRASAD, R. *et al.* *Antifungals: Mechanism of Action and Drug Resistance*. *Yeast Membrane Transport*, p.327–349, 2016.
- QI, S.; ROSER, S. *et al.* Insights into the Role of Polymer-Surfactant Complexes in Drug Solubilisation/Stabilisation During Drug Release from Solid Dispersions, *Pharm. Res.* v. 30, p. 290-302, 2012.
- QUEIROZ-TELLES, F.; BUCCHERI, R.; BENARD, G. Sporotrichosis In Immunocompromised Hosts. *Journal of Fungi*, v.5, n.1, 2019.
- RAJ, S.D.; AMIT, T.; AMIT, E.J.. Solubilization of poorly soluble drugs: a review, *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research* , v.2, n.1, 91-99, 2011.
- RHEE, Y. *et al.* Formulation of parenteral microemulsion containing itraconazole. *Archive of Pharmaceutical Research* , v. 30(1), 114–123, 2008. doi:10.1007/bf02977787
- RODRIGUES, A.M. *et al.* Sporothrix Species Causing Outbreaks in Animals and Humans Driven by Animal–Animal Transmission. *PLOS Pathogens*, 12(7), 2016.
- RODRIGUES, M. L.; ALBUQUERQUE, P. C. Searching for a change: The need for increased support for public health and research on fungal diseases. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v. 12, n. 16, 2018.
- RODRIGUES, M.I. Negligenciadas entre as negligenciadas: perspectiva de prevenção, controle e diagnóstico de doenças causadas por fungos. *Textos para Discussão*; n. 36. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 22p., 2019.
- ROSSATO, L. *Sporothrix brasiliensis*: aspectos imunológicos e virulência. 2017. 137f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2017.
- ROSSI, C.N.; ODAGUIRI, J.; LARSSON, C.E.. Retrospective assessment of the treatment of sporotrichosis in cats and dogs using itraconazole. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 41 (1), p. 1-5, 2013. <https://www.redalyc.org/pdf/2890/289031817017.pdf>
- ROWE, R.C.; SHESKEY, P.J.; QUINN, M.E. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 6<sup>a</sup> ed. p 66-68, 2009.
- RYU, K.A. *et al.* Topical Delivery of Coenzyme Q10-Loaded Microemulsion for Skin Regeneration. *Pharmaceutics*, v. 12(4), 2020.
- SARFRAZ, R.M. *et al.* Application of various polymers and polymers based techniques used to improve solubility of poorly water soluble drugs: a review. *Drug Research*, v. 74(2), p.347-356, 2017.

- SCHUBACH T.M.P.; SCHUBACH A.; OKAMOTO, T.I. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998–2001), *Journal of American Veterinary Medical Association*, v.224, p.1623-1629, 2004.
- SCHUBACH, A.; BARROS, M.B.; WANKE, B. Epidemic sporotrichosis. *Current Opinion in Infect Diseases*. v.21, n.2, p.129-133, 2008.
- SEEDHER, N.; KANOJIA, M., Micellar solubilization of some poorly soluble antidiabetic 603 drugs: a technical note. *AAPS PharmSciTech* v. 9 (2), p. 431-436, 2008.
- SERRANO, D. R. *et al.* Tuning the Transdermal Delivery of Hydroquinone upon Formulation with Novel Permeation Enhancers. *Pharmaceutics*, v.11, n.4, p.167, 2019.
- SHAMA, R.; BASHA, M. Soluplus®: A novel polymeric solubilizer for optimization of Carvedilol solid dispersions: Formulation design and effect of method of preparation. *Powder Technology*. v.237, p.406-414, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2012.12.038>
- SHAPIRO, R.S.; ROBBINS, N.; COWEN, LE. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* v.75, p.213–267, 2011
- SHARMA, G. *et al.* Benzyl Benzoate-Loaded Microemulsion for Topical Applications: Enhanced Dermatokinetic Profile and Better Delivery Promises. *American Association of Pharmaceutical Scientists*. v. 17, p.1221-1231, 2015.
- SILVA, C.M.; SILVA, T.L.; PINTO, I.M. Caracterização reológica de fluidos não newtonianos e sua aplicabilidade na indústria. *Ciências exatas e tecnológicas*. v. 5, n. 2, p. 285-300, 2019
- SILVA, C.M.B. Formulação de gel termossensível mucoadesivo contendo cloridrato de pilocarpina para tratamento da xerostomia. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 86f, 2017.
- SILVA, F. *et al.* Desenvolvimento e controle de qualidade de um gel-creme antiacneico a base do óleo da *Copaífera officinalis* L. (copaíba). *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, v. 30, 2019.
- SILVA, J.D.F. *et al.* Microemulsions: components, characteristics, potentialities in food chemistry and other applications. *Química Nova*, v. 38 (9), 2015.
- SILVA, M.B. *et al.* Urban sporotrichosis: a neglected epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. *Cad Saude Publica*. v. 28(10); p.1867–1880; 2012.
- SILVA, S.; MICHNIAK-KOHN, B.; LEONARDI, G.R. An overview about oxidation in clinical practice of skin aging. *An. Bras. Dermatol.* v. 92, p. 367–374, 2017.
- SINGH, B. *et al.* Self-Emulsifying Drug Delivery Systems (SEDDS): Formulation Development, Characterization, and Applications. *Critical Reviews™ In Therapeutic Drug Carrier Systems*, v. 26, n. 5, p. 427-521, 2009.
- SIQUEIRA, J. Avaliação da estabilidade de uma emulsão cosmética cold cream contendo diferentes tipos de ceras. Monografia de conclusão de curso. Centro Universitário Univates. Lajeado, 26p, 2019.

- SONG, Y., *et al.* Sporothrix globosa melanin inhibits antigen presentation by macrophages and enhances deep organ dissemination. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 52, p. 19-31, 2020. doi:10.1007/s42770-020-00345-7
- STEINBRENNER, I. *et al.* Influence of the Oil Phase and Topical Formulation on the Wound Healing Ability of a Birch Bark Dry Extract. *PLOS ONE*, v. 11(5), 2016.
- STRICKLEY, R.G. Solubilizing Excipients in Oral and Injectable Formulations. *Pharm Res* 21, 201–230, 2004.
- SU, R. *et al.* Formulation, development, and optimization of a novel octyldodecanol-based nanoemulsion for transdermal delivery of ceramide III B. *International Journal of Nanomedicine*, v. 12, p. 5203–5221, 2017. doi:10.2147/ijn.s139975
- SUETH-SANTIAGO, V. *et al.* CYP51: Uma Boa Ideia? *Rev. Virtual Quim.*, v. 7 (2), 539-575, 2015.
- SZYMCZYK, K.; SZANIAWSKA, M.; KRAWCZYK, J. Temperature Effect on the Adsorption and Volumetric Properties of Aqueous Solutions of Kolliphor®ELP. *Molecules*, v. 25(3), 2020. doi:10.3390/molecules25030743
- TACHIBANA, T.; T. MATSUYAMA; M. MITSUYAMA. Characteristic infectivity of *Sporothrix schenckii* to mice depending on routes of infection and inherent fungal pathogenicity. *Med. Mycol.* v.36, p.21–27, 1998.
- TADROS, T. Polymeric surfactants in disperse systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, 147-148, 281–299, 2009.
- TAMARU, S. *et al.* High correlation between octanol-air partition coefficient and aroma release rate from O/W emulsions under non-equilibrium. *Food Research International*, 2018.
- TAO, T. *et al.* Preparation and evaluation of itraconazole dihydrochloride for the solubility and dissolution rate enhancement, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 367, p. 109–114, 2009.
- THE UNITED States Pharmacopeia, v.1. 38th ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, Inc. 2015.
- THE UNITED States Pharmacopeia, v.1. 42nd ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, Inc. 2019.
- THOMSON, J. *et al.* An atypical cause of sporotrichosis in a cat. *Medical Mycology Case Reports*. v.23, p. 72-76, 2019.
- TUNG, N.T. *et al.* Formulation and biopharmaceutical evaluation of supersaturatable self-nanoemulsifying drug delivery systems containing silymarin. *Int J Pharm*, v. 555; p.63-76, 2019.
- TUOMELA, A.; HIRVONEN, J.; PELTONEN, L. Stabilizing Agents for Drug Nanocrystals: Effect on Bioavailability. *Pharmaceutics*, v. 8(2): 16, 2016.
- VARELA-GARCIA, A.; CONCEIRO, A.; ALAVAREZ-LORENZO, C. Soluplus micelles for acyclovir ocular delivery: Formulation and cornea and sclera permeability. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 552, p. 39–47, 2018. doi:10.1016/j.ijpharm.2018.09.053

- VARGAS, B.A. *et al.* Development of Topical Hydrogels Containing Genistein-Loaded Nanoemulsions. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 8(2), p. 330–336, 2012. doi:10.1166/jbn.2012.1386
- VÁSQUEZ-DEL-MERCADO E. *et al.* Sporotrichosis. *Clinics in Dermatology*. v.30, p.437-443, 2012.
- VEMULA, V.R.; LAGISHETTY, V.; LINGALA, V. Solubility enhancement techniques. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. v. 5(1), 2010.
- VERMA, S.B. *et al.* Topical Itraconazole Formulations: Unscrupulous Pharmaceutical Companies and Lax Indian Drug Regulators Endangering a Precious Drug. *Indian Dermatol Online J.* 11(5): 806–811, 2020.
- VIANA, P.G.; *et al.* Clinical and epidemiological aspects of the largest epidemic of sporotrichosis in dogs: 203 cases [2004–2014]. In: Proceeding of the 7th Trends in Medical Mycology; Oct; Lisbon, Portugal. *Mycoses*. v.58, p.145, 2015.
- WILLEMS, L.; VAN DER GEEST, R.; BEULE, K. Itraconazole oral solution and intravenous formulations: a review of pharmacokinetics and pharmacodynamiks. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapy*. v.26, n.3, p.159-169, 2001.
- WILLIAMS, A. C., & BARRY, B. W. Penetration enhancers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56(5), 603–618, 2004.
- WU, S.. Tackling Fungal Resistance by Biofilm Inhibitors. *Med. Chem*, v. 60, p. 2193–2211, 2017.
- XIE, J., *et al.* Potential confounding effects of benzyl alcohol as a formulation excipient support the elimination of the abnormal toxicity test from pharmacopoeias. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. v.73, n.2, 509–514, 2019.
- YANG H. *et al.* Investigation of a nanosuspension stabilized by Soluplus® to improve bioavailability. *Int. J. Pharm.* v. 477; p.88–95, 2014.
- ZAITZ, C. *et al.* Esporotricose. *Compêndio de Micologia Médica*.1 ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1998: 127-137
- ZENG, Y., LI, S., LIU, C. Soluplus micelles for improving the oral bioavailability of scopoletin and their hypouricemic effect in vivo. *Acta Pharmacol Sin* v. 38, p. 424–433, 2017. <https://doi.org/10.1038/aps.2016.126>
- ZHANG, S. *et al.* Formulation and Evaluation of a Novel Oral Oil-Based Suspension Using Micro-environmental pH-Modifying Solid Dispersion. *AAPS PharmSciTech*, v. 20(2), 2019.
- ZHANG, Y., LANE, M. E., & MOORE, D. J. An Investigation of the Influence of PEG 400 and PEG-6-Caprylic/Capric Glycerides on Dermal Delivery of Niacinamide. *Polymers*, v. 12(12), 2020. doi:10.3390/polym12122907
- ZHENHAO, D. *et al.* Design and Development of Pharmaceutical Excipients Database. *Mode Tradit Chin Med Mater Med*,13(4): 611–615, 2011.
- ZHOU, A.M. *et al.* Global its diversity in the *Sporothrix schenckii* complex, *Fungal Divers*. v. 66, n.1, p. 153–165, 2014.

ZHOU, T. *et al.* Micelle carriers based on macrogol 15 hydroxystearate for ocular delivery of terbinafine hydrochloride: In vitro characterization and in vivo permeation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 109, p. 288-296, 2017.









## ANEXO 1- Formulações

Formulações:	S89	S90	S91	S92	S93	S94	S95	S96	S97	S98	S99	S100	S101	S102	S103	S104	S105	S106	S107	S108
<b>Excipientes</b>																				
Itraconazol	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
X1	12	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	10	2	10	4	4
X2	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	8	8	8	8	-	8	-	-
X3	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	3	5	5	5
X4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X5	4	4	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	10	7	7	7	-	7	-	-
X6	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	-	5	5	0	-	-	-	-
X7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X8	30	30	31,98	29,98	29,98	29,98	29,98	29,98	29,98	29,98	29,98	30	30	29,73	29,75	30	30	24	30	35
X9	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
X10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X11	6	6	6	6	6	6	6	6	4	6	6	-	20	5	3	-	-	-	-	-
X12	15	15	15	12	12	10,5	11	9,5	13	11,3	11,5	21	-	7	11	14	14	20	30	30
X13	-	-	-	3	-	3	3	3	3	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X14	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	5	5	3	-	-	-	-	-
X15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X16	7	7	6	7	7	7	7	7	7	7	7	7	-	7	7	20	50	20	30	25
X17	-	-	-	-	3	1,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	-	0,25	0,25	-	-	-	-	-
X18	-	-	-	-	-	-	-	2	0,5	0,2	-	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-
X19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X20	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	-	5	-	-
X21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X24	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	-	-	0,02	-	-	-	-	-	-



## ANEXO 2: Protocolo CEUA: 24/2020

17/04/2020

Gmail - Decisão Final - Aprovado - Protocolo CEUA: 24/2020 (CEUA-UFMG)



Camila Oliveira &lt;sfo.camila@gmail.com&gt;

**Decisão Final - Aprovado - Protocolo CEUA: 24/2020 (CEUA-UFMG)**

2 mensagens

 ceua@prpq.ufmg.br <ceua@prpq.ufmg.br>  
 Para: sfo.camila@gmail.com

30 de março de 2020 09:49

  
**UFMG**

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

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: Camila 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/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [ceua@prpq.ufmg.br](mailto:ceua@prpq.ufmg.br)

 Camila Oliveira <sfo.camila@gmail.com>  
 Para: Marcelo Teixeira Paiva <marcelo\_theltn@hotmail.com>

30 de março de 2020 12:08

Boas novas!!!!


 Camila Stefanie Fonseca de Oliveira  
 Professora Adjunta  
 Saúde Pública Veterinária  
 +55 31 3409 2090  
 DMVP - Escola de Veterinária - UFMG

[Texto das mensagens anteriores oculto]

### **ANEXO 3- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

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

---

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:

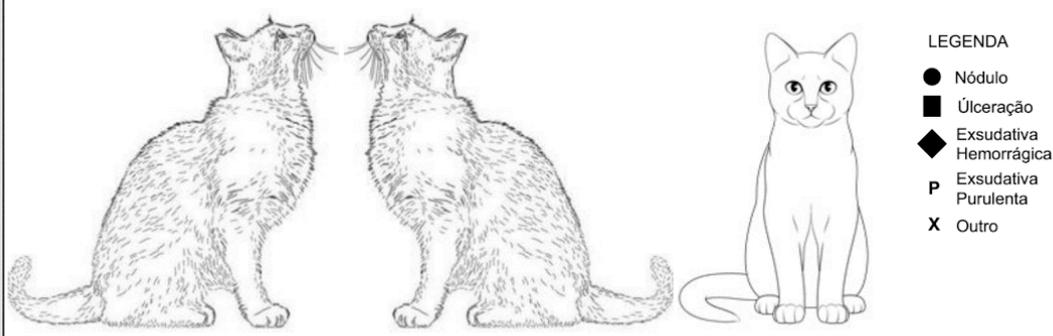
**COEP-UFMG - Comissão de Ética em Pesquisa da UFMG**

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 4- Fichas clínicas

Ficha de Acompanhamento Clínico de Gato com Esporotricose				ID nº: _____	Data: ___/___/___
<b>Resenha</b>	1. Nome do animal	2. Raça	3. sexo	4. Castrado?	5. Idade
	6. Pelagem			7. Apresenta acesso à rua?	
	8. Vacinação (data estimada e tipos)			9. Desverminação (data estimada)	
<b>Tutor</b>	10. Nome				
	11. Endereço				
	12. Contato (telefone e e-mail caso possua)				
<b>Laboratorial</b>	13. Cultura Micológica		14. Data de Coleta		15. Data do resultado
	Resultado:		____/____/____		____/____/____
	16. Citopatologia		17. Data de Coleta		18. Data do resultado
	Resultado:		____/____/____		____/____/____
19. outros exames solicitados ao tutor					
20. Temperatura (°C)	21. Peso (Kg)	22. Freq cardíaca (bpm)	23. Freq respiratória (rpm)		
24. Nos desenhos abaixo marque o local e tipo de lesões cutâneas observadas, conforme a legenda					
					
Em caso de presença de outro tipo de lesão cutânea descreva-a abaixo.					
<b>Exame Clínico</b>					
25. Sintomatologia respiratória					
26. Demais sinais clínicos observados					
27. Recebe alguma medicação atualmente? (nome, dose, etc)					