

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Faculdade de Ciências da Saúde

Mikaella Costa de Sousa

**DESENVOLVIMENTO DE FILME POLIMÉRICO CARREGADO COM
IMIQUIMODE E TERBINAFINA PARA O TRATAMENTO TÓPICO DA
CROMOBLASTOMICOSE**

Brasília
2026

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Faculdade de Ciências da Saúde

Mikaella Costa de Sousa

**DESENVOLVIMENTO DE FILME POLIMÉRICO CARREGADO COM
IMIQUIMODE E TERBINAFINA PARA O TRATAMENTO TÓPICO DA
CROMOBLASTOMICOSE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme M. Gelfuso

Brasília

2026

Mikaella Costa de Sousa

**DESENVOLVIMENTO DE FILME POLIMÉRICO CARREGADO COM
IMIQUIMODE E TERBINAFINA PARA O TRATAMENTO TÓPICO DA
CROMOBLASTOMICOSE**

Banca examinadora

Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso (Presidente)
Universidade de Brasília (UnB)

Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Borin
Universidade de Brasília (UnB)

Prof. Dr. Ricardo Neves Marreto
Universidade Federal de Goiás (UFG)

Prof^a. Dr^a. Taís Gratieri (Suplente)
Universidade de Brasília (UnB)

*Dedico aos meus amados pais, Reginaldo e Marinalva; ao meu
esposo, Jonathan; ao meu irmão, Lucas; e à minha doce, Liz.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que até aqui me sustentou.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso, pela oportunidade e acolhimento na realização desta pesquisa, por toda confiança depositada, orientação e disponibilidade que sempre demonstrou. Agradeço pela sabedoria e conhecimentos transmitidos além de toda paciência e otimismo no decorrer do percurso. Me sinto privilegiada em ser sua aluna.

Aos meus pais, Reginaldo de Sousa e Marinalva Costa, que, mesmo tendo poucas oportunidades de estudo, sempre acreditaram na educação como caminho de transformação. Que sempre foram meu alicerce, meu exemplo de força, dignidade e perseverança. Cada conquista minha carrega o amor, os ensinamentos e os valores que vocês plantaram em meu coração. Ao meu irmão, Lucas, que é meu tudo. Seu amor, sua torcida e sua presença foram fundamentais em cada etapa dessa caminhada.

Ao meu esposo, Jonathan, companheiro de vida e sonhos, pelo apoio incondicional, pela paciência nos dias difíceis, por acreditar em mim e por nunca permitir que eu desistisse, mesmo quando o caminho parecia difícil demais.

À minha filha, Liz, por quem me esforcei, me reinventei e rompi tantas barreiras. Que você cresça compreendendo a importância da ciência e o valor de uma mulher ocupar esse espaço com competência, fé e coragem. Que você possa voar mais alto e alcançar horizontes que talvez eu apenas tenha começado a desbravar.

Aos meus avós, homens e mulheres simples da roça, que talvez não compreendam exatamente esta caminhada, mas que me ensinaram valores que nenhuma universidade poderia oferecer, humildade, trabalho e honestidade.

Às minhas tias e primas, em especial Stéfany Costa, mulheres fortes e extraordinárias, que são exemplos de resistência, fé e determinação. Vocês me lembram diariamente da força que existe em nós.

Aos meus queridos amigos de laboratório Jaya, Giovanna, Jonad, Bruna, Rebeca, Rayssa, Thamires, Dayane, Zahra, Rafael e Gusa, pelo acolhimento e por todo o apoio na superação dos desafios enfrentados, por compartilharem conhecimentos e experiências ao longo dessa caminhada. Em especial, aos meus “irmãos científicos” Camila, Marianne, Breno, Paula, Mateus, Samuel, Larissa e Nara, pelo apoio, ajuda, carinho e força. Agradeço também àqueles que já passaram pelo laboratório e deixaram sua valiosa contribuição, Lucas e Luma. Um agradecimento especial a Seila e Geisa, que me deram a motivação necessária para retomar minha trajetória na ciência.

À Prof.^a Dr.^a Larissa Fernandes Matos, pela oportunidade e apoio, bem como aos professores Prof. Dr. Marcílio e Prof.^a Dr.^a Taís Gratieri, pela disponibilização dos recursos materiais e intelectuais que possibilitaram a realização desta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF), pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa e à bolsa durante o mestrado.

A todos que fizeram parte dessa jornada, através do carinho e da amizade, que me fortaleceram para superar qualquer desafio encontrado.

RESUMO

A cromoblastomicose (CBM) é uma micose subcutânea crônica, de evolução lenta e progressiva, caracterizada por lesões cutâneas persistentes, frequentemente refratárias às terapias convencionais. As opções terapêuticas disponíveis são limitadas, requerem tratamentos prolongados e estão associadas a efeitos adversos, baixa adesão e elevadas taxas de recidiva. Nesse contexto, a associação entre imiquimode (IMQ), um imunomodulador capaz de estimular a resposta imune local, e terbinafina (TBF), um antifúngico amplamente utilizado no tratamento de micoses profundas, surge como uma estratégia terapêutica promissora, baseada na complementaridade de seus mecanismos de ação. Além disso, a administração tópica desses fármacos pode favorecer a deposição local dos ativos, reduzir a exposição sistêmica e minimizar efeitos adversos. Diante desse cenário, o presente estudo teve como objetivo desenvolver e caracterizar um sistema terapêutico tópico inovador baseado em filmes poliméricos de quitosana contendo a associação IMQ–TBF como alternativa para o tratamento da CBM. Inicialmente, foi desenvolvido e validado um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de fluorescência (CLAE-FL) para a determinação simultânea de IMQ e TBF na presença de interferentes provenientes de pele e formulação. O método apresentou elevada sensibilidade, seletividade e recuperação da pele ($>98,5\%$ para IMQ e $>99,8\%$ para TBF), demonstrando adequação aos parâmetros de validação analítica avaliados. A compatibilidade química entre os fármacos e os excipientes foi investigada por meio de análise térmica, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e modelagem computacional, não sendo observados indícios de interação química ou degradação dos ativos, confirmando a viabilidade da sua incorporação na matriz polimérica. Os filmes foram obtidos por *casting* e caracterizados quanto às propriedades macroscópicas, mecânicas, bioadesivas, morfológicas, peso, espessura, pH, teor e intumescimento. As formulações F-C17 e F-C18 foram selecionadas por apresentarem superfície homogênea, resistência mecânica e grau de intumescimento compatível com as características requeridas para conferir bioadesividade e liberação dos fármacos. Os filmes apresentaram pH compatível com os locais de aplicação (5,4 e 5,8) e teor de fármacos próximo ao valor teórico ($779,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). A análise morfológica confirmou a formação de matriz homogênea e o estudo de estabilidade indicou manutenção de espessura e pH dos filmes por 30 dias. A liberação *in vitro* avaliada por 12 horas em células de Franz demonstrou perfil sustentado para ambos os fármacos. O filme F-C17 promoveu maior deposição de IMQ ($104,8 \pm 14,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) e TBF ($105,1 \pm 20,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) nas camadas viáveis da pele em comparação ao F-C18 ($66,4 \pm 15,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e $69,3 \pm 20,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), evidenciando a influência do ácido oleico como promotor de permeação dos fármacos. O ensaio HET-CAM demonstrou ausência de potencial irritante, indicando segurança para aplicação tópica. Em conjunto, os resultados demonstram que os filmes de quitosana com IMQ–TBF constituem uma plataforma promissora, representando alternativa terapêutica potencialmente eficaz e segura para a CBM.

Palavras-chave: cromoblastomicose, filme polimérico, quitosana, liberação tópica.

ABSTRACT

Chromoblastomycosis (CBM) is a chronic, slow-progressing subcutaneous mycosis characterized by persistent cutaneous lesions, often refractory to conventional therapies. Current therapeutic options are limited, require prolonged treatment, and are associated with adverse effects, low patient compliance, and high recurrence rates. In this context, the combination of imiquimod (IMQ), an immunomodulator capable of stimulating local immune response, and terbinafine (TBF), an antifungal widely used for deep mycoses, emerges as a promising strategy based on their complementary mechanisms of action. Furthermore, topical administration may favor local drug deposition, reduce systemic exposure, and minimize side effects. Given this scenario, this study aimed to develop and characterize an innovative topical therapeutic system based on chitosan polymeric films containing the IMQ–TBF combination as an alternative for CBM treatment. Initially, an analytical method using high-performance liquid chromatography coupled with a fluorescence detector (HPLC-FL) was developed and validated for the simultaneous determination of IMQ and TBF in the presence of skin and formulation interferences. The method showed high sensitivity, selectivity, and skin recovery (>98.5% for IMQ and >99.8% for TBF), demonstrating adequacy to the evaluated analytical validation parameters. Chemical compatibility between drugs and excipients was investigated through thermal analysis, Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), and computational modeling; no signs of chemical interaction or degradation were observed, confirming the feasibility of drug incorporation into the polymeric matrix. The films were obtained by casting and characterized regarding macroscopic, mechanical, mucoadhesive, and morphological properties, as well as weight, thickness, pH, drug content, and swelling. Formulations F-C17 and F-C18 were selected for their homogeneous surface, adequate mechanical strength, and swelling degree compatible with required mucoadhesiveness and drug release. The films presented a pH compatible with application sites (5.4 and 5.8) and drug content close to the theoretical value (779.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Morphological analysis confirmed the formation of a homogeneous matrix, and the stability study indicated maintenance of film thickness and pH for 30 days. In vitro release evaluated over 12 hours in Franz diffusion cells demonstrated a sustained profile for both drugs. The F-C17 film promoted higher deposition of IMQ ($104.8 \pm 14.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) and TBF ($105.1 \pm 20.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) in the viable skin layers compared to F-C18 ($66.4 \pm 15.4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ and $69.3 \pm 20.8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectively), highlighting the influence of oleic acid as a permeation enhancer. The HET-CAM assay showed no irritant potential, indicating safety for topical application. Taken together, the results demonstrate that chitosan films containing the IMQ–TBF combination constitute a promising platform, representing a potentially effective and safe therapeutic alternative for CBM.

Keywords: chromoblastomycosis, polymeric film, chitosan, topical drug delivery.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo das principais camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme. Fonte: Junqueira <i>et al.</i> , 2018.	5
Figura 2. Representação esquemática da epiderme, evidenciando suas principais camadas: estrato córneo, camada granulosa, camada espinhosa e camada basal. Fonte: Cardoso, 2025. .	6
Figura 3. Representação esquemática das principais rotas de permeação cutânea: transcelular, intercelular e anexial (folículos pilosos e glândulas sudoríparas), responsáveis pela penetração dos fármacos através da epiderme até a derme. Fonte: Cardoso, 2025.	8
Figura 4. Tipos de lesões da CBM, classificados de acordo com o grau de severidade. (A) Lesões leves; (B) Lesões moderadas; (C) Lesões severas. Fonte: Adaptado de Queiroz-Telles <i>et al.</i> , 2017.	9
Figura 5. Fórmula estrutural do cloridrato de terbinafina. Fonte: Kanakapura; Penmatsa, 2016.	17
Figura 6. Fórmula estrutural do imiquimode. Fonte: Argenziano <i>et al.</i> , 2019.....	18
Figura 7. Fórmula estrutural da quitosana. Fonte: Aycan; Yayla; Aydin, 2020.	22
Figura 8. Fórmula estrutural do ácido oleico. Fonte: Teló <i>et al.</i> , 2017.....	23
Figura 9. Esquema representativo do procedimento de separação das camadas da pele. O EC foi removido por <i>tape stripping</i> , enquanto a PR foi fragmentada em pequenos pedaços. Ambas as frações foram posteriormente submetidas à extração para quantificação. EC – Estrato córneo; PR – pele remanescente. Fonte: Autoria própria.	27
Figura 10. Esquema representativo do preparo dos filmes poliméricos contendo IMQ e TBF. Fonte: Autoria própria.	35
Figura 11. Representação do ensaio de intumescimento dos filmes. Fonte: Autoria própria.	40
Figura 12. Esquema representativo do teste de propriedade mecânica realizado em texturômetro (Stable Micro Systems TA-XT Plus) com os filmes de quitosana. Fonte: Autoria própria.....	41
Figura 13. Representação do ensaio de bioadesividade. Módulo do texturômetro TA-XT2 (Stable Micro Systems), no momento de deslocamento do disco de mucina e no contato entre o disco de mucina e o filme. Fonte: Autoria própria.	42
Figura 14. Célula de difusão e seus componentes. Fonte: Autoria própria.....	43
Figura 15. Sistema de difusão vertical Phoenix DB-6 (Teledyne Hanson). Fonte: Adaptado de Tolentino, 2024.....	44
Figura 16. Representação esquemática do ensaio HET-CAM. Fonte: Adaptado de Tolentino, 2024.	46

Figura 17. Cromatogramas representativos de IMQ e de TBF, comparados aos interferentes isolados do EC, PR, MR e filme sem fármacos, obtidos seguindo o método estabelecido CLAE-FL. IMQ – imiquimode; TBF – cloridrato de terbinafina; EC – estrato córneo; PR – pele remanescente e MR – meio receptor. Fonte: Autoria própria. 52

Figura 18. Avaliação da seletividade dos métodos de quantificação para (A) IMQ e (B) TBF, em metanol e na presença de possíveis interferentes, expressa como diferença entre as áreas dos picos. Análise estatística realizada por ANOVA ($p \leq 0,001$). IMQ – imiquimode; TBF – cloridrato de terbinafina; EC – estrato córneo; PR – pele remanescente; MR – meio receptor. Fonte: Autoria própria. 53

Figura 19. Representação gráfica das curvas analíticas. (A) TBF na faixa de concentração de 0,1 a 2,0 $\mu\text{g/mL}$; equação da reta: $y = 223373x + 1467,8$; $r^2=0,9995$ e (B) IMQ na faixa de concentração de 0,01 a 1,0 $\mu\text{g/mL}$; equação da reta: $y = 20000000x - 47158$; $r^2=0,9992$. IMQ – imiquimode; TBF – cloridrato de terbinafina. Fonte: Autoria própria. 54

Figura 20. Estruturas moleculares de IMQ (a) e de TBF (b), bem como suas respectivas formas predominantes em condições fisiológicas (a' e b'; pH 7,4; 310,15 K). IMQ – imiquimode e TBF – cloridrato de terbinafina. Fonte: Autoria própria. 63

Figura 21. Descrição inicial dos ambientes de solvatação para os pares IMQ e TBF. Ambos os ambientes contêm, além dos pares de fármacos, 200 moléculas de água. IMQ – imiquimode e TBF – cloridrato de terbinafina. 65

Figura 22. Primeira derivada de análises termogravimétricas (DrTGA) de IMQ (A), TBF (B) da mistura física dos componentes dos filmes e dos filmes prontos F-C17 e F-C18. Cada evento de perda de massa é indicado em porcentagem (%). IMQ - imiquimode; TBF - cloridrato de terbinafina; PVA - álcool polivinílico; F-C17 - filme contendo imiquimode e cloridrato de terbinafina com 1% de ácido oleico; F-C18 – filme contendo imiquimode e cloridrato de terbinafina com 2% de ácido oleico. Fonte: Autoria própria. 66

Figura 23. Termogramas obtidos por análise de DSC de IMQ e TBF, da mistura dos componentes do filme e dos filmes prontos F-C17 e F-C18. Taxa de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C/min}$, de 25 a 400 $^{\circ}\text{C}$, sob amostra controlada de nitrogênio. IMQ – imiquimode; TBF – cloridrato de terbinafina; F-C17 – filme contendo imiquimode e cloridrato de terbinafina com 1% de ácido oleico; F-C18 – filme contendo imiquimode e cloridrato de terbinafina com 2% de ácido oleico. Fonte: Autoria própria. 68

Figura 24. Espectros de FTIR de IMQ, TBF e da mistura física IMQ + TBF registrados na faixa de 4000–500 cm^{-1} . Fonte: Autoria própria. IMQ – imiquimode; TBF – cloridrato de terbinafina. 70

Figura 25. Aspecto macroscópico dos filmes poliméricos de quitosana obtidos por *casting*. (F-A1) quitosana 0,5% e (F-A2) quitosana 1%. Os filmes foram utilizados para avaliação visual de homogeneidade, continuidade e manuseabilidade (Formulação 1). Fonte: Autoria própria. 71

Figura 26. Aspecto macroscópico dos filmes poliméricos de quitosana obtidos por *casting*, contendo diferentes concentrações de plastificantes. (F-B1) PEG 400 2%; (F-B2) PEG 400 3%; (F-B3) glicerina 2%; (F-B4) glicerina 3%; (F-B5) sorbitol 2%; (F-B6) sorbitol 3%. Os filmes

foram utilizados para avaliação visual de homogeneidade, continuidade e manuseabilidade (Formulação 2). Fonte: Autoria própria. 72

Figura 27. Aspecto macroscópico dos filmes obtidos durante a etapa de desenvolvimento da formulação, avaliando diferentes solubilizantes e técnicas de incorporação dos fármacos. As imagens correspondem às formulações que permitiram o desmolde após a secagem. Fonte: Autoria própria. 74

Figura 28. Representação gráfica dos resultados dos ensaios mecânicos para força máxima aplicada (A) e alongamento (B) dos filmes. Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=3). Análise estatística realizada por ANOVA seguida de teste de Tukey, sendo (*) = $p \leq 0,05$, (***) = $p \leq 0,001$ (****) = $p \leq 0,0001$. Os filmes contendo os fármacos não apresentaram ruptura nas condições do ensaio, de modo que os valores apresentados em (A) correspondem à força máxima aplicada pelo equipamento. F-C17: filme contendo 1% de ácido oleico; F-C18: filme contendo 2% de ácido oleico. Fonte: Autoria própria. 80

Figura 29. Microscopia eletrônica de varredura do filme polimérico branco contendo 1% de ácido oleico. (A) e (B) seção transversal, (C), (D) superfície do filme, (E) e (F) superfície do filme em maior ampliação. Fonte: Autoria própria. 84

Figura 30. Microscopia eletrônica de varredura do filme polimérico branco contendo 2% de ácido oleico. (A) (B) seção transversal; (C) superfície do filme; (D) superfície do filme em maior ampliação. Fonte: Autoria própria. 85

Figura 31. Microscopia eletrônica de varredura do filme polimérico contendo IMQ e TBF (F-C17). (A) (B) seção transversal, (C) superfície do filme, (D) superfície do filme em aumento de 2.500 x, (E) e (F) superfície do filme em maior ampliação. IMQ – imiquimode; TBF – cloridrato de terbinafina; F-C17 – filme contendo imiquimode e cloridrato de terbinafina com 1% de ácido oleico. Fonte: Autoria própria. 86

Figura 32. Microscopia eletrônica de varredura do filme polimérico contendo IMQ e TBF (F-C18). (A) (B) seção transversal, (C) superfície do filme, (D) superfície do filme em aumento de 500 x. IMQ – imiquimode; TBF – cloridrato de terbinafina; F-C18 – filme contendo imiquimode e cloridrato de terbinafina com 2% de ácido oleico. Fonte: Autoria própria. 87

Figura 33. Avaliação macroscópica da estabilidade dos filmes F-C17 e F-C18 ao longo de 30 dias de armazenamento em temperatura ambiente e a 4 °C. As imagens correspondem aos dias 0, 7, 14 e 30 após o preparo. TA – Temperatura ambiente. Fonte: Autoria própria. 88

Figura 34. Perfil de liberação do IMQ (A) e de TBF (B) a partir dos filmes F-C17, F-C18 ou controle contendo os fármacos livres em suspensão, na mesma concentração (2% de IMQ e TBF) no período de 12 h. Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=5). IMQ – imiquimode; TBF – cloridrato de terbinafina; F-C17: filme contendo imiquimode e cloridrato de terbinafina com 1% de ácido oleico; F-C18: filme contendo imiquimode e cloridrato de terbinafina com 2% de ácido oleico. Fonte: Autoria própria. 90

Figura 35. Quantificação de IMQ (A) e de TBF (B) recuperados das camadas da pele (estrato córneo – EC e pele remanescente – PR) após 12 horas de ensaio *in vitro* de penetração cutânea, a partir dos filmes F-C17, F-C18 ou controle contendo os fármacos livres em suspensão, na mesma concentração (2% de IMQ e TBF). Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=5). Análise estatística por ANOVA, seguida do teste de Tukey, sendo

(***)= $p \leq 0,001$; (****)= $p \leq 0,0001$. IMQ - imiquimode; TBF - cloridrato de terbinafina; F-C17: filme contendo imiquimode e cloridrato de terbinafina com 1% de ácido oleico; F-C18: filme contendo imiquimode e cloridrato de terbinafina com 2% de ácido oleico. Fonte: Autoria própria..... 92

Figura 36. Avaliação do potencial irritativo pelo ensaio HET-CAM (Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane). As imagens apresentam os resultados obtidos para o controle positivo, controle negativo, filmes F-C17 e F-C18 aplicados diretamente sobre a membrana, bem como para as respectivas soluções das formulações. As imagens foram registradas após a aplicação das amostras na membrana cório-alantóide dos ovos embrionados, nos tempos de 30, 120 e 300 segundos. Fonte: Autoria própria..... 95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das misturas físicas de IMQ, TBF e dos demais componentes dos filmes para a realização do estudo de compatibilidade. IMQ – imiquimode; TBF – cloridrato de terbinafina; F-C17 – filme contendo imiquimode e cloridrato de terbinafina com 1% de ácido oleico; F-C18 – filme contendo imiquimode e cloridrato de terbinafina com 2% de ácido oleico.	33
Tabela 2. Proporção dos constituintes utilizados na triagem de plastificantes na composição da matriz polimérica dos filmes (Etapa B).	36
Tabela 3. Classificação do potencial irritante segundo o índice de irritabilidade.	47
Tabela 4. Condições cromatográficas testadas no desenvolvimento do método CLAE com detecção UV e fluorescência para quantificação simultânea de IMQ e TBF. IMQ – imiquimode; TBF – cloridrato de terbinafina.	49
Tabela 5. Valores teóricos dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do IMQ e do TBF. IMQ – imiquimode; TBF – cloridrato de terbinafina.	55
Tabela 6. Precisão mensurada pela repetibilidade dos métodos analíticos de IMQ e de TBF. IMQ – imiquimode; CV – coeficiente de variação; TBF – cloridrato de terbinafina.	56
Tabela 7. Resultados dos experimentos de precisão analisados por CLAE-FL para a determinação de IMQ e TBF, com precisão intermediária em solução padrão. IMQ – imiquimode; TBF – cloridrato de terbinafina; CV – coeficiente de variação; TBF – cloridrato de terbinafina; EC - estrato córneo; PR – pele remanescente.	57
Tabela 8. Valores de recuperação de IMQ e de TBF quantificados nas diferentes camadas da pele, por extração com metanol durante 24 horas. IMQ – imiquimode; TBF – cloridrato de terbinafina. EC – estrato córneo; PR – pele remanescente.	58
Tabela 9. Solubilidade de IMQ e TBF em diferentes meios. Resultados apresentados como média $\pm$ DP; N = 3. IMQ – imiquimode; TBF – cloridrato de terbinafina.	59
Tabela 10. Estabilidade da solução de IMQ e TBF em tampão acetato pH 4,0, considerando o tempo inicial por até 24 horas após o preparo da solução. IMQ – imiquimode; TBF – cloridrato de terbinafina.	61
Tabela 11. Estabilidade do IMQ e TBF em amostras armazenadas em geladeira ($\pm$ 4 °C) e em temperatura ambiente por até 30 dias após o preparo em metanol, para avaliar a estabilidade analítica.	62
Tabela 12. Parâmetros físico-químicos para IMQ e TBF - logaritmo da constante de partição (logKp), logaritmo do coeficiente de distribuição (logD) e área da superfície polar topológica (TPSA, Å ²). IMQ – imiquimode; TBF – cloridrato de terbinafina.	63
Tabela 13. Avaliação macroscópica dos filmes poliméricos quanto à concentração de quitosana – formulação 1. (F-A1) 0,5% de quitosana; (F-A2) 1% de quitosana.	72

Tabela 14. Avaliação macroscópica dos filmes poliméricos em relação ao plastificante – formulação 2. (F-B1) PEG 400 2%; (F-B2) PEG 400 3%; (F-B3) glicerina 2%; (F-B4) glicerina 3%; (F-B5) sorbitol 2%; (F-B6) sorbitol 3%. 73

Tabela 15. Caracterização dos filmes de quitosana obtidos pela técnica de evaporação de solvente contendo 779,2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de IMQ e TBF. Massa, espessura e pH dos filmes poliméricos (média $\pm$ DP, $n = 3$). IMQ – imiquimode e TBF – cloridrato de terbinafina; F-C17 – filme contendo imiquimode e cloridrato de terbinafina com 1% de ácido oleico; F-C18 – filme contendo imiquimode e cloridrato de terbinafina com 2% de ácido oleico. 76

Tabela 16. Teor de IMQ e TBF nos filmes poliméricos. O teor foi determinado em amostras de área definida (1 cm^2) e expresso em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. O teor por filme foi estimado a partir do teor por área, considerando a área total de 3,85 cm^2 . Os resultados representam a média de três determinações independentes ($n = 3$). IMQ – imiquimode; TBF – cloridrato de terbinafina. . 77

Tabela 17. Intumescimento (%) dos filmes F-C17 (1% de ácido oleico) e F-C18 (2% de ácido oleico), contendo IMQ e TBF, em água purificada e tampão acetato de sódio pH 4,0 (média $\pm$ DP, $n = 3$). IMQ – imiquimode; TBF – cloridrato de terbinafina. 78

Tabela 18. Força máxima de bioadesão dos filmes poliméricos em condição seca e umedecida, expressa em Newton (N). Os valores representam a média $\pm$ DP ($n = 3$). 82

Tabela 19. Avaliação da estabilidade física dos filmes F-C17 e F-C18 ao longo de 30 dias de armazenamento em 4 $^{\circ}\text{C}$ e temperatura ambiente. Valores de peso (g) e espessura (mm) expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$). F-C17 – filme contendo IMQ e TBF com 1% de ácido oleico; F-C18 - filme contendo IMQ e TBF com 2% de ácido oleico. 89

Tabela 20. Valores de regressão linear (r^2) obtidos pela aplicação dos perfis de liberação nos modelos de ordem zero, Higuchi, primeira ordem, Weibull e Hixson Crowell. 91

Tabela 21. Índice de irritabilidade calculado após a aplicação do teste de HET-CAM para controle positivo, controle negativo, filmes (F-C17 e F-C18) e dispersão filmogênica, e sua respectiva classificação. Resultados representados com média ($n=3$) $\pm$ DP. 96

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Estratégias de incorporação e solubilização dos fármacos na matriz polimérica previamente selecionada (Etapa C). Os filmes foram preparados a partir da formulação base, variando-se a estratégia de incorporação e os agentes de solubilização, com posterior avaliação macroscópica da integridade da matriz e da presença de precipitados após a secagem.....37

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CBM	Cromoblastomicose
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSC	Do inglês, <i>Differential Scanning Calorimetry</i>
EC	Estrato córneo
FAP-DF	Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal
F-C17	Filme de quitosana com imiquimode e cloridrato de terbinafina (1% de ácido oleico)
F-C18	Filme de quitosana com imiquimode e cloridrato de terbinafina (2% de ácido oleico)
FTIR	Do inglês, <i>Fourier Transformed infrared spectroscopy</i>
HET-CAM	<i>Hen's Egg Test - Chorioallantoic Membrane</i>
IMQ	Imiquimode
ICH	Do inglês, <i>International Council for Harmonization</i>
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
PR	Pele remanescente
PVA	Álcool polivinílico
TBF	Cloridrato de terbinafina
TGA	Do inglês, <i>Thermogravimetric Analysis</i>
UV	Ultravioleta
FL	Fluorescência

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS.....	4
2.1	OBJETIVO GERAL	4
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
3	REVISÃO DA LITERATURA	5
3.1	ESTRUTURA, COMPOSIÇÃO E FUNÇÕES DA PELE.....	5
3.1.1	Mecanismos de permeação de fármacos através da pele	7
3.2	CROMOBLASTOMICOSE	9
3.2.1	Condições Dermatológicas na Cromoblastomicose	11
3.2.2	Resposta Imune e Mecanismos de Cronicidade na Cromoblastomicose.....	13
3.2.3	Tratamento da Cromoblastomicose	14
3.2.4	Cloridrato de Terbinafina	16
3.2.5	Imiquimode	17
3.2.6	Associação do Imiquimode e do Cloridrato de Terbinafina	19
3.3	FILMES COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO.....	19
3.3.1	Quitosana.....	21
3.3.2	Ácido Oleico	23
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1	MATERIAL.....	26
4.1.1	Reagentes e Insumos.....	26
4.1.2	Pele	26
4.1.2.1	Obtenção da Pele de Suínos	26
4.1.2.2	Separação das Camadas da Pele	27
4.2	PREPARO DA SOLUÇÃO ESTOQUE PARA O DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	27
4.3	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO	28
4.3.1	Condições Cromatográficas.....	28
4.3.2	Validação do Método Analítico.....	29
4.3.2.1	Seletividade.....	29
4.3.2.2	Linearidade	29
4.3.2.3	Limites de Detecção e Quantificação	30
4.3.2.4	Precisão	30
4.3.2.5	Exatidão	31
4.4	SOLUBILIDADE DO IMQ E DA TBF	31

4.5	ESTABILIDADE DE IMQ E TBF NOS SOLVENTES.....	32
4.6	ESTUDO DE COMPATIBILIDADE ENTRE OS FÁRMACOS E EXCIPIENTES DO FILME.....	32
4.6.1	Preparo das amostras	32
4.6.2	Análise termogravimétrica (TGA).....	33
4.6.3	Calorimetria de varredura diferencial (DSC).....	33
4.6.4	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) ...	33
4.6.5	Estudo de modelagem molecular para avaliação de interação entre IMQ e TBF	34
4.7	DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES CONTENDO IMQ E TBF	34
4.7.1	Obtenção dos filmes.....	34
4.7.1.1	Avaliação dos plastificantes.....	35
4.7.1.2	Estratégias de incorporação dos fármacos	36
4.7.2	Caracterização dos filmes	38
4.7.2.1	Avaliação das características macroscópicas.....	38
4.7.2.2	Peso e espessura.....	38
4.7.2.3	Determinação do pH	38
4.7.2.4	Determinação do teor de IMQ e TBF	39
4.7.2.5	Grau de intumescimento	39
4.7.2.6	Propriedades mecânicas	40
4.7.2.7	Avaliação da bioadesividade.....	41
4.7.2.8	Morfologia	42
4.8	ESTUDO DE ESTABILIDADE.....	42
4.9	ESTUDOS <i>IN VITRO</i> DE LIBERAÇÃO DE IMQ E TBF A PARTIR DOS FILMES	43
4.10	ENSAIOS <i>IN VITRO</i> DE PENETRAÇÃO CUTÂNEA	45
4.11	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IRRITATIVO DOS FILMES.....	45
4.11.1	Ensaio <i>in vitro</i> em membrana cório-alantoide de ovos de galinha embrionados (HET-CAM).....	45
4.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	48
5.1.1	Desenvolvimento do método analítico.....	48
5.1.2	Seletividade.....	51
5.1.3	Linearidade	53

5.1.4	Limites e detecção e quantificação	55
5.1.5	Precisão.....	56
5.1.6	Exatidão.....	57
5.2	SOLUBILIDADE DE IMQ E TBF	59
5.3	ESTABILIDADE ANALÍTICA DE IMQ E TBF	60
5.4	ESTUDO DE COMPATIBILIDADE ENTRE OS FÁRMACOS E EXCIPIENTES DO FILME.....	62
5.4.1	Estudos in sílico de dinâmica e reatividade molecular.....	62
5.4.2	Análise de compatibilidade entre IMQ e TBF	65
5.4.3	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) ...	69
5.5	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES CONTENDO IMQ E TBF ..	71
5.5.1	Peso e espessura	76
5.5.2	Teor dos filmes	77
5.5.3	Grau de intumescimento	77
5.5.4	Propriedades mecânicas.....	79
5.5.5	Bioadesividade	81
5.5.6	Morfologia	83
5.6	ESTUDO DE ESTABILIDADE DE IMQ E TBF	87
5.7	ESTUDOS <i>IN VITRO</i> DE LIBERAÇÃO DE IMQ E TBF A PARTIR DOS FILMES	89
5.8	ENSAIOS <i>IN VITRO</i> DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA	91
5.9	AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DOS FILMES	94
6	CONCLUSÕES	97

1 INTRODUÇÃO

A cromoblastomicose (CBM) é uma micose subcutânea crônica de evolução lenta, caracterizada pelo acometimento do tecido cutâneo e subcutâneo e pela formação de lesões granulomatosas persistentes, frequentemente associadas à fibrose, hiperqueratose e resposta inflamatória prolongada (SANTOS *et al.*, 2021). A infecção ocorre geralmente após a inoculação traumática de hifas ou conídios presentes no ambiente em pele previamente lesionada, favorecendo o estabelecimento do fungo no tecido hospedeiro. Nesse contexto, a resposta imune local frequentemente se mostra insuficiente para erradicar o patógeno, contribuindo para a cronicidade da infecção e para a dificuldade de resolução terapêutica (AMEEN, 2009; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017).

Diversos fungos demáceos podem causar a CBM; entretanto, o principal agente etiológico é *Fonsecaea pedrosoi*, micro-organismo amplamente encontrado em plantas e no solo de regiões tropicais e subtropicais. Em virtude dessa ampla distribuição ambiental, trabalhadores rurais constituem o principal grupo de risco para o desenvolvimento da doença, devido à exposição constante ao solo e a materiais vegetais contaminados. Clinicamente, a CBM caracteriza-se por lesões cutâneas polimórficas, frequentemente verrucosas ou nodulares, de evolução progressiva e difícil resolução, podendo apresentar complicações secundárias, como infecções bacterianas e potencial transformação neoplásica em casos crônicos (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2021).

Apesar dos avanços no tratamento das micoses profundas, as opções terapêuticas disponíveis para a CBM permanecem limitadas. O tratamento padrão baseia-se principalmente na administração sistêmica de antifúngicos, com destaque para itraconazol e terbinafina (TBF), utilizados isoladamente ou em associação. A TBF é amplamente empregada na prática clínica devido à sua atividade fungicida, decorrente da inibição da enzima esqualeno epoxidase, etapa fundamental da via biossintética do ergosterol, componente essencial da membrana celular fúngica (RYDER, 1992). Entretanto, a resposta clínica nem sempre é satisfatória, sendo frequentes os casos de recidiva, a necessidade de tratamentos prolongados e a ocorrência de efeitos adversos sistêmicos, como hepatotoxicidade e distúrbios gastrointestinais. Além disso, a baixa adesão ao tratamento pode favorecer o desenvolvimento de resistência antifúngica (PASSERO *et al.*, 2021).

Abordagens terapêuticas complementares, como crioterapia, termoterapia e procedimentos cirúrgicos, também podem ser empregadas, especialmente em lesões localizadas. No entanto, tais estratégias apresentam limitações relacionadas à extensão,

profundidade e localização das lesões, além de não serem eficazes em todos os estágios da doença (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017). Dessa forma, o manejo clínico da CBM ainda representa um desafio terapêutico relevante.

Embora a TBF seja amplamente utilizada na prática clínica, ainda não existem formulações tópicas estruturadas especificamente desenvolvidas para o tratamento da CBM que permitam sua administração localizada de forma controlada. Essa lacuna evidencia a necessidade do desenvolvimento de sistemas farmacêuticos capazes de promover maior deposição do fármaco diretamente no sítio da infecção, reduzindo a exposição sistêmica e, consequentemente, minimizando os efeitos adversos associados ao tratamento prolongado.

Nesse contexto, estratégias terapêuticas que combinem ação antifúngica direta e modulação da resposta imune local podem representar uma abordagem promissora. O imiquimode (IMQ), um imunomodulador amplamente utilizado no tratamento de doenças dermatológicas, atua como agonista dos receptores *Toll-like 7* (TLR-7), promovendo a ativação da imunidade inata e adaptativa por meio do aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, como interferon- α , fator de necrose tumoral e interleucinas (BELDA; CRIADO; PASSERO, 2020; DE SOUSA *et al.*, 2014; LOGAN *et al.*, 2023; SCHÖN, 2007). Dessa forma, a associação entre um antifúngico de ação direta, como a TBF, e um modulador da resposta imune, como o IMQ, pode atuar de forma complementar, promovendo simultaneamente a redução da carga fúngica e a intensificação da resposta imunológica no microambiente da lesão.

Adicionalmente, considerando as características hiperqueratóticas, espessas e irregulares das lesões da CBM, torna-se fundamental o emprego de tecnologias farmacêuticas que favoreçam maior tempo de permanência da formulação no local de aplicação e maior contato com o tecido infectado. A incorporação de fármacos em sistemas tópicos estruturados, como filmes bioadesivos, pode permitir a liberação controlada dos ativos, além de favorecer a adesão à superfície da lesão e aumentar potencialmente a eficácia terapêutica (RAMINENI *et al.*, 2013). Esses sistemas também podem contribuir para a redução da frequência de aplicação e para a melhoria da adesão do paciente ao tratamento.

Entre os polímeros utilizados no desenvolvimento desses sistemas, a quitosana destaca-se como um biomaterial promissor devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade. Sua natureza policatiônica confere propriedades bioadesivas relevantes, permitindo interações eletrostáticas com componentes carregados negativamente da superfície cutânea, o que favorece o prolongamento do tempo de residência da formulação no sítio de aplicação (ARANAZ *et al.*, 2009). Além disso, a quitosana apresenta atividade antimicrobiana intrínseca

e propriedades que podem contribuir para a modulação da resposta inflamatória e para o processo de cicatrização tecidual. Essas características tornam esse polímero particularmente interessante para o desenvolvimento de sistemas destinados ao tratamento de lesões crônicas e hiperqueratósicas, como aquelas observadas na CBM, podendo ainda favorecer a penetração dos fármacos incorporados (DESAI *et al.*, 2023; MURA *et al.*, 2022).

Diante desse cenário, o presente trabalho propôs o desenvolvimento e a caracterização de um filme polimérico bioadesivo à base de quitosana contendo a associação de IMQ e TBF para aplicação tópica no tratamento da CBM. A estratégia visa promover a liberação sustentada e consistente dos fármacos, aumentar sua disponibilidade local no sítio de infecção e contribuir para o desenvolvimento de uma abordagem terapêutica potencialmente mais segura e eficaz para o manejo dessa micose negligenciada.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi desenvolver e caracterizar um filme bioadesivo à base de quitosana contendo a associação de IMQ e TBF para aplicação tópica no tratamento da CBM, visando promover a liberação sustentada dos fármacos e aumentar sua disponibilidade no local da infecção.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e validar um método analítico seletivo para a quantificação simultânea de IMQ e TBF em matrizes complexas;
- Avaliar a compatibilidade físico-química entre IMQ, TBF e os excipientes da formulação;
- Desenvolver e caracterizar o sistema polimérico quanto às suas propriedades estruturais e funcionais;
- Avaliar a estabilidade físico-química das formulações desenvolvidas ao longo do tempo;
- Determinar o perfil de liberação *in vitro* de IMQ e TBF a partir dos filmes poliméricos;
- Avaliar a penetração cutânea *in vitro* dos fármacos;
- Verificar a segurança das formulações para uso tópico.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ESTRUTURA, COMPOSIÇÃO E FUNÇÕES DA PELE

A pele é o maior órgão do corpo humano e desempenha funções essenciais de proteção, regulação térmica e percepção sensorial, além de participar ativamente da resposta imunológica. Atua como barreira física contra agentes químicos, físicos e biológicos, além de limitar a perda transepidérmica de água, contribuindo para a manutenção da homeostase corporal (CHAMBERS; VUKMANOVIC-STEJIC, 2019; MICHALAK *et al.*, 2021; ZAIDI; LANIGAN, 2010).

Estruturalmente, a pele é organizada em duas camadas principais (Figura 1): epiderme e derme, apoiadas pelo tecido subcutâneo (hipoderme), as quais se articulam de forma integrada para garantir proteção e funcionalidade (KHAVKIN; ELLIS, 2011).

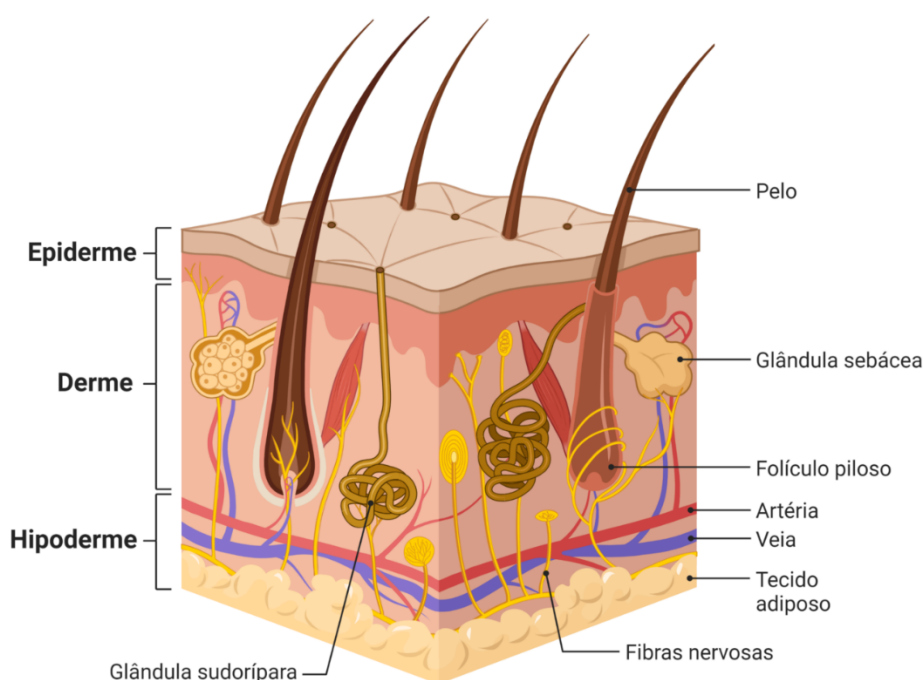


Figura 1. Esquema representativo das principais camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme. Fonte: Junqueira *et al.*, 2018.

A epiderme constitui a camada mais externa da pele e é composta predominantemente por queratinócitos, além de melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel. Diferentemente da derme, não apresenta vascularização própria, sendo nutrida por difusão a partir dos capilares dérmicos. Subdivide-se em camadas bem definidas: camada basal, camada espinhosa, camada granulosa e estrato córneo (EC) (BONTÉ *et al.*, 2019; KHAVKIN; ELLIS, 2011; ROGER *et al.*, 2019).

O EC é a camada mais externa da epiderme, composto por queratinócitos que se diferenciaram em corneócitos. À medida que migram para a superfície, os queratinócitos sofrem um processo de diferenciação progressiva. Tornam-se mais achatados, acumulam filamentos de queratina e perdem gradualmente o núcleo e as organelas. Esse processo culmina na formação do EC, constituído por corneócitos anucleados imersos em uma matriz lipídica altamente organizada (BONTÉ *et al.*, 2019; MICHALAK *et al.*, 2021; ROGER *et al.*, 2019). O EC é frequentemente descrito pelo modelo “tijolo e cimento”, no qual os corneócitos representam os tijolos e os lipídios intercelulares (principalmente ceramidas, colesterol e ácidos graxos livres) correspondem ao cimento. Essa organização estrutural confere à pele sua principal função de barreira (CHAMBERS; VUKMANOVIC-STEJIC, 2019).

Logo abaixo, está a camada granulosa, formada por grânulos visíveis de querato-hialina. Em seguida, encontra-se a camada espinhosa, composta por queratinócitos poligonais ricos em filamentos de queratina, que se conectam entre si por meio dos desmossomos (canais de proteínas), conferindo coesão mecânica ao tecido. Esses queratinócitos contêm grânulos lamelares ricos em lipídios, fundamentais para a formação da barreira cutânea (BONTÉ *et al.*, 2019).

Por fim, a camada basal (Figura 2), também chamada germinativa, é composta por uma única camada de queratinócitos colunares mitoticamente ativos, aderidos à membrana basal por meio de hemidesmossomos. Essas células são responsáveis pela renovação contínua da epiderme. Alterações nessa camada podem comprometer o controle proliferativo e afetar o equilíbrio homeostático da pele (MICHALAK *et al.*, 2021).

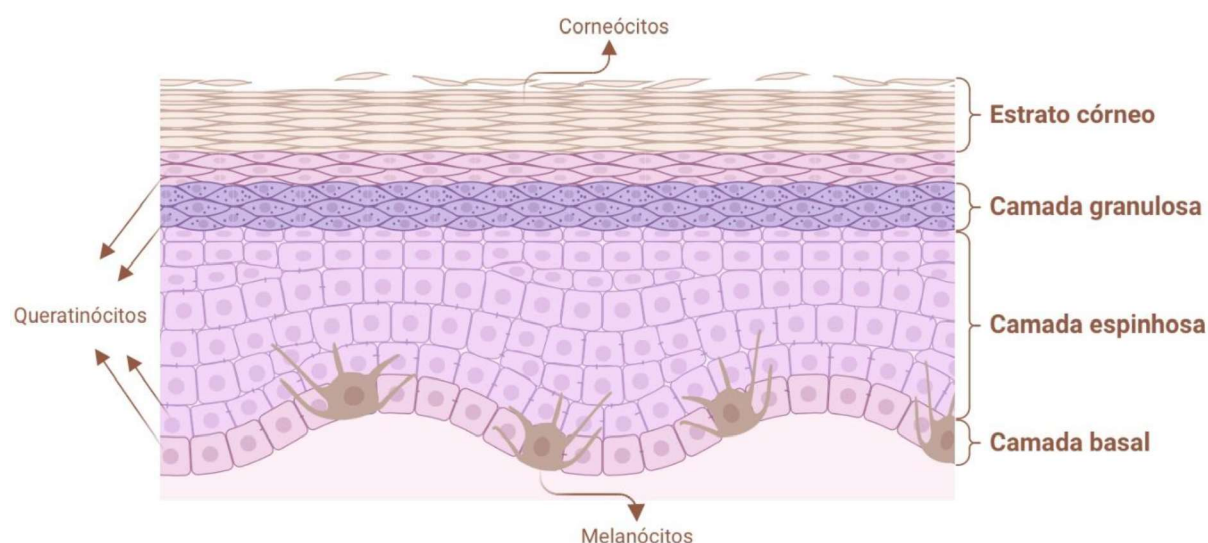


Figura 2. Representação esquemática da epiderme, evidenciando suas principais camadas: estrato córneo, camada granulosa, camada espinhosa e camada basal. Fonte: Cardoso, 2025.

Os melanócitos, localizados principalmente na camada basal, produzem melanina em melanossomas e a transferem aos queratinócitos. A melanina atua como filtro natural contra radiação ultravioleta (BONTÉ *et al.*, 2019; CHAMBERS; VUKMANOVIC-STEJIC, 2019). As células de Langerhans desempenham papel fundamental na imunidade cutânea, atuando como células apresentadoras de antígenos e participando da vigilância imunológica (BONTÉ *et al.*, 2019; LEONARDI *et al.*, 2018). Essa característica é particularmente relevante em doenças infecciosas cutâneas, como a CBM, nas quais a resposta imune local influencia diretamente a evolução da lesão.

Abaixo da epiderme, encontra-se a derme, composta por tecido conjuntivo rico em fibras de colágeno e de elastina, responsáveis pela resistência e elasticidade cutânea. Nessa camada estão presentes fibroblastos, mastócitos, macrófagos, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e terminações nervosas. A derme é responsável pelo suporte estrutural da epiderme, pela nutrição tecidual e pela participação na resposta inflamatória. Além disso, abriga os anexos cutâneos, como os folículos pilosos, as glândulas sebáceas e as glândulas sudoríparas (BONTÉ *et al.*, 2019; ZAIDI; LANIGAN, 2010).

A hipoderme, por sua vez, corresponde à região mais interna da pele e é composta predominantemente por tecido adiposo. Os adipócitos armazenam lipídios e atuam como reserva energética, além de funcionarem como isolante térmico e amortecedor mecânico contra traumas. Essa camada também contém vasos sanguíneos e nervos de maior calibre (BARONI *et al.*, 2012; BONTÉ *et al.*, 2019; WONG *et al.*, 2016).

3.1.1 Mecanismos de permeação de fármacos através da pele

O tratamento dermatológico por via tópica pressupõe a aplicação de um medicamento diretamente sobre a pele, com o objetivo de obter efeito localizado e restrito a uma determinada área de interesse. Esse tipo de abordagem oferece vantagens em comparação aos tratamentos por via oral e parenteral, como redução da exposição sistêmica, diminuição de efeitos adversos e possibilidade de utilizar menores doses do fármaco. Apesar dessas vantagens, a via tópica apresenta desafios importantes relacionados à penetração cutânea, pois a pele possui características estruturais que limitam a passagem de substâncias químicas para os tecidos subjacentes (PHATALE *et al.*, 2022; ZAIDI; LANIGAN, 2010). A principal limitação dessa via está associada à função de barreira do EC, cuja organização lipídica altamente estruturada restringe a penetração de substâncias hidrofílicas e de alto peso molecular (BOUWSTRA *et al.*, 2003).

No que se refere à permeação cutânea, os fármacos podem atravessar a pele por três vias principais: via intercelular (paracelular), o fármaco difunde-se ao longo da matriz lipídica, contornando os corneócitos. Via transcelular, a molécula atravessa diretamente os corneócitos, alternando a partição entre as regiões lipídicas e proteicas. Via anexial, a absorção ocorre por meio dos folículos pilosos, glândulas sebáceas ou sudoríparas, consideradas rotas secundárias, porém relevantes para algumas formulações (ELMOWAFY, 2021; GRATIERI *et al.*, 2008; PHATALE *et al.*, 2022) (Figura 3).

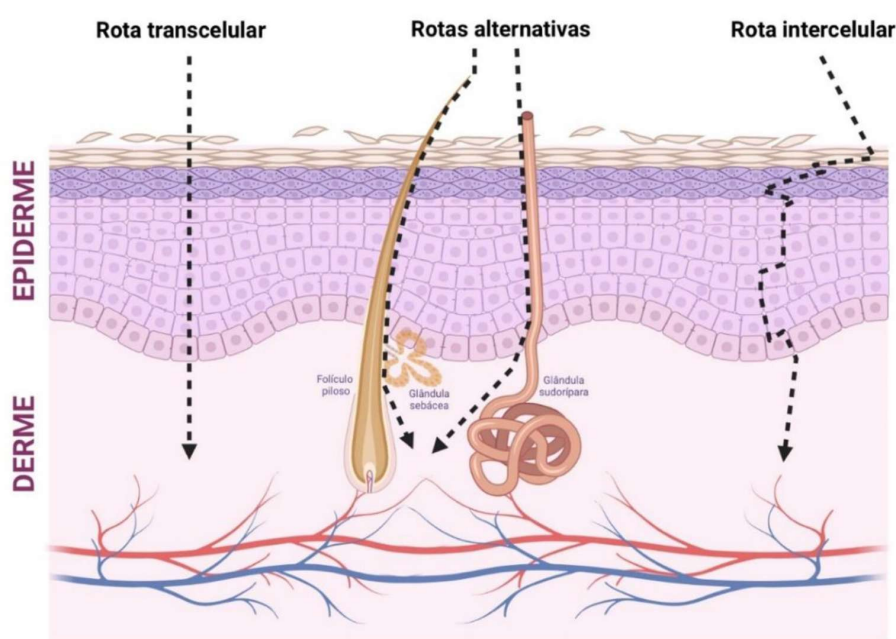


Figura 3. Representação esquemática das principais rotas de permeação cutânea: transcelular, intercelular e anexial (folículos pilosos e glândulas sudoríparas), responsáveis pela penetração dos fármacos através da epiderme até a derme. Fonte: Cardoso, 2025.

A efetividade da permeação depende das propriedades físico-químicas do fármaco, como peso molecular reduzido (preferencialmente inferior a 500 Da), lipofilicidade moderada e coeficiente de partição adequado (GHEZZI *et al.*, 2021; MOSER, 2001). Em muitos casos, torna-se necessário o uso de intensificadores de permeação, capazes de alterar temporariamente a organização lipídica do EC ou de aumentar a hidratação local, favorecendo a difusão do ativo (MOSER, 2001; TAVARES LUIZ *et al.*, 2021).

Considerando as características estruturais e funcionais das camadas da pele, bem como as propriedades físico-químicas dos fármacos, estudos vêm sendo desenvolvidos para criar sistemas de liberação e de permeação cutânea mais eficazes, especialmente para fármacos pouco permeáveis. Além disso, o sistema farmacêutico desempenha um papel determinante na modulação da liberação do fármaco e na interação com a superfície cutânea. Nesse contexto,

sistemas poliméricos estruturados, como filmes bioadesivos, podem prolongar o tempo de residência no sítio de aplicação, promover maior hidratação local e favorecer um gradiente de concentração adequado para a difusão do fármaco (PHATALE *et al.*, 2022).

3.2 CROMOBLASTOMICOSE

A CBM é uma micose subcutânea crônica, de evolução lenta e caráter progressivo, que acomete o tecido cutâneo e subcutâneo. Clinicamente, caracteriza-se por lesões polimórficas que podem se manifestar como pápulas, nódulos, placas verrucosas e ulcerações, frequentemente associadas a hiperqueratose e espessamento epidérmico. A progressão da doença é gradual, podendo se estender por anos ou décadas quando não tratada adequadamente, o que contribui para deformidades locais e importante comprometimento funcional (AMEEN, 2009; SANTOS *et al.*, 2021).

Os membros inferiores são as regiões mais acometidas, especialmente os pés e as pernas, o que se relaciona com o mecanismo de infecção, geralmente decorrente da inoculação traumática de hifas ou conídios presentes no solo ou em material vegetal contaminado (Figura 4). A penetração do fungo ocorre por meio de pequenas lesões de continuidade da pele, favorecendo o estabelecimento da infecção no tecido subcutâneo e a formação de um processo inflamatório crônico granulomatoso (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017).



Figura 4. Tipos de lesões da CBM, classificados de acordo com o grau de severidade. (A) Lesões leves; (B) Lesões moderadas; (C) Lesões severas. Fonte: Adaptado de Queiroz-Telles *et al.*, 2017.

Do ponto de vista etiológico, a CBM é causada por fungos demáceos pertencentes à ordem *Chaetothyriales* e à família *Herpotrichiellaceae*. Entre os principais gêneros envolvidos estão *Fonsecaea*, *Cladophialophora*, *Phialophora* e *Rhinocladiella*, sendo *Fonsecaea pedrosoi* o agente etiológico mais frequentemente isolado em regiões tropicais. Esses microrganismos apresentam melanina na parede celular, o que aumenta sua resistência ao estresse oxidativo e dificulta sua eliminação pelo sistema imune, favorecendo sua permanência no tecido (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2021).

A CBM é considerada uma doença negligenciada, com maior prevalência em países tropicais e subtropicais da América Latina, África e Ásia. Já foram identificados mais de 7.740 casos de CBM em todos os continentes, sendo a América do Sul a região com maior número de registros (2.619 casos), seguida pela África (1.875 casos) e pela América Central e México (1.628 casos). O Brasil destaca-se como um dos países com maior número de casos relatados, principalmente nas regiões Norte e Nordeste. A incidência estimada da CBM no Brasil é de aproximadamente 3 casos por 100.000 habitantes (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2021).

A doença acomete predominantemente homens adultos em idade produtiva, especialmente trabalhadores rurais, agricultores e indivíduos com exposição ocupacional ao solo e à vegetação, o que reforça seu impacto socioeconômico. A incidência é difícil de mensurar com precisão dada a subnotificação inerente a doenças negligenciadas, mas estudos indicam que casos graves e crônicos são frequentes, com pacientes convivendo com a doença por décadas sem resolução clínica adequada (PASSERO *et al.*, 2021).

No tecido infectado, observa-se a presença das chamadas células muriformes, ou corpos escleróticos, estruturas fúngicas espessas e pigmentadas que representam a forma adaptativa do patógeno no hospedeiro. Essas células apresentam elevada resistência à fagocitose e contribuem para a manutenção da infecção crônica (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017). A persistência dessas estruturas no tecido está relacionada a um padrão de resposta imune predominantemente ineficiente, com desequilíbrio na ativação de vias do tipo Th1, fundamentais para o controle de infecções fúngicas intracelulares. Como consequência, desenvolve-se processo inflamatório contínuo, com formação de granulomas, deposição progressiva de colágeno e fibrose dérmica, além de hiperplasia epidérmica e hiperqueratose acentuada (DA GLÓRIA SOUSA *et al.*, 2011; PASSERO *et al.*, 2021).

As alterações estruturais observadas nas lesões, como hiperqueratose e fibrose, representam um desafio adicional para a eficácia de terapias tópicas convencionais. A

hiperqueratose e a reorganização da matriz extracelular dérmica podem limitar a penetração de fármacos e comprometer sua biodisponibilidade local, reforçando a necessidade de sistemas de liberação capazes de prolongar o tempo de contato e favorecer a permeação cutânea (DONNELLY *et al.*, 2006; LOGAN *et al.*, 2023).

3.2.1 Condições Dermatológicas na Cromoblastomicose

A pele íntegra constitui uma barreira altamente organizada, cuja principal função é restringir a perda de água e impedir a entrada de agentes externos. Essa função está diretamente relacionada à estrutura do EC, formado por corneócitos anucleados, imersos em uma matriz lipídica composta principalmente por ceramidas, colesterol e ácidos graxos livres (BOUWSTRA *et al.*, 2003). Essa organização estrutural é determinante para a baixa permeabilidade cutânea e representa o principal obstáculo à penetração de fármacos administrados por via tópica (GHEZZI *et al.*, 2021; GRATIERI *et al.*, 2008; MOSER, 2001).

Na CBM, entretanto, essa arquitetura sofre alterações significativas, as lesões iniciais podem evoluir para cinco tipos clínicos distintos: nodular, tumoral, verrucoso, em placa e cicatricial, sendo os três primeiros os mais comuns. As lesões crônicas são caracterizadas por intensa resposta inflamatória, presença de células muriformes, formação de granulomas, fibrose progressiva e marcada hiperqueratose (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2021). Essas alterações estruturais modificam profundamente o microambiente cutâneo e impactam diretamente a dinâmica de penetração de fármacos.

A pele acometida apresenta alterações estruturais e inflamatórias significativas, decorrentes da infecção fúngica crônica. Na epiderme, observa-se o espessamento do epitélio, decorrente da hiperplasia da camada espinhosa, associado à proliferação celular e a tentativa do organismo de promover a eliminação transepidérmica do fungo, mecanismo pelo qual o agente infeccioso é gradualmente conduzido em direção à superfície cutânea. Nessas regiões, o fungo é frequentemente encontrado em associação com células inflamatórias, principalmente neutrófilos, formando pequenos focos inflamatórios na camada córnea (DE BRITO; BITTENCOURT, 2018; PASSERO *et al.*, 2021; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017).

Na derme, desenvolve-se uma reação inflamatória granulomatosa, caracterizada pelo acúmulo de diferentes populações celulares do sistema imune, incluindo macrófagos, linfócitos e neutrófilos, em torno do fungo. Esse padrão inflamatório reflete uma tentativa persistente do organismo de conter a infecção, sendo que a quantidade de fungos e a organização da resposta inflamatória podem variar conforme o tipo e o estágio da lesão, com maior carga fúngica em lesões verrucosas e menor em lesões mais antigas (DE BRITO; BITTENCOURT, 2018). Com

a progressão da doença, a resposta inflamatória crônica pode ser gradualmente substituída por fibrose nas camadas mais profundas da pele, resultando em tecido mais endurecido e menos permeável (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017).

Essas alterações morfológicas e funcionais da pele acometida pela CBM têm implicações diretas para a terapia tópica, uma vez que o espessamento do EC, a reorganização tecidual e a presença de tecido fibroso podem dificultar a penetração e a difusão de fármacos até os focos infecciosos localizados em camadas mais profundas (GHEZZI *et al.*, 2021; GRATIERI *et al.*, 2008).

Além das alterações estruturais, o processo inflamatório crônico modifica parâmetros locais relevantes, como a hidratação, o pH e a composição lipídica da pele. A inflamação persistente pode aumentar a perda transepidérmica de água e alterar a organização dos lipídios intercelulares, modificando o coeficiente de partição dos fármacos e sua difusão através da barreira cutânea (BOUWSTRA *et al.*, 2003; PEREIRA *et al.*, 2020).

Outro aspecto relevante é a presença de granulomas e áreas de necrose, que criam microambientes heterogêneos no interior da lesão. Considerando que as células muriformes apresentam elevada resistência à fagocitose e persistem no tecido por longos períodos (BELDA *et al.*, 2023), a manutenção de níveis locais sustentados de antifúngicos e imunomoduladores torna-se essencial para o controle da doença.

Essas alterações impõem desafios importantes. A simples aplicação de formulações semissólidas convencionais pode não garantir tempo de residência suficiente, nem promover gradiente de concentração adequado para difusão através das camadas da lesão (BELDA *et al.*, 2023; DE SOUSA *et al.*, 2014). Dessa forma, torna-se necessário o desenvolvimento de sistemas capazes de aumentar o tempo de contato com a lesão e manter liberação sustentada do fármaco na pele.

Nesse contexto, o desenvolvimento de sistemas tópicos bioadesivos, como filmes poliméricos à base de quitosana, pode representar uma estratégia promissora. Ao aderirem à superfície irregular da lesão, esses sistemas favorecem a oclusão local, prolongam o tempo de contato com o tecido infectado e mantêm um gradiente de concentração contínuo do fármaco. Esses fatores favorecem a penetração cutânea e podem contribuir para maior eficácia terapêutica no tratamento da CBM (ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009; RAMINENI *et al.*, 2013).

3.2.2 Resposta Imune e Mecanismos de Cronicidade na Cromoblastomicose

A resposta imunológica do hospedeiro desempenha papel central na evolução clínica da CBM. Após a inoculação traumática dos fungos demáceos, o sistema imune inato é ativado pelo reconhecimento de componentes da parede fúngica por receptores de reconhecimento padrão (PRRs), presentes em macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. Esse reconhecimento inicial desencadeia produção de citocinas pró-inflamatórias e recrutamento celular para o sítio da infecção (DA GLÓRIA SOUSA *et al.*, 2011; QUEIROZ-TELLES, 2017; PASSERO *et al.*, 2021).

Apesar dessa ativação inicial, a eliminação do patógeno raramente ocorre de forma eficiente. Um dos principais fatores associados à persistência da infecção é a presença de melanina na parede celular dos fungos, que confere proteção contra espécies reativas de oxigênio produzidas por fagócitos, reduzindo a eficácia da resposta imunológica (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017; SIQUEIRA *et al.*, 2017). Essa característica contribui para a adaptação do fungo na pele e favorece sua sobrevivência prolongada.

No tecido infectado, observa-se a formação de células muriformes, também chamadas de corpos escleróticos, consideradas a forma parasitária adaptada do fungo no hospedeiro. Essas estruturas apresentam parede celular espessa, pigmentada e altamente resistente à fagocitose, sendo associadas à manutenção do processo inflamatório crônico (DE BRITO; BITTENCOURT, 2018; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2021). A persistência dessas células no tecido cutâneo estimula uma resposta granulomatosa contínua, com fibrose progressiva e espessamento epidérmico.

Do ponto de vista da imunidade adaptativa, o perfil de citocinas liberadas depende da severidade da doença, que é determinada pelo tipo de resposta imune realizada pelo hospedeiro. Respostas do tipo Th1, caracterizadas pelo aumento na produção de interferon gama (IFN- γ), estão associadas à ativação de macrófagos e a um maior potencial de controle da infecção. Em contrapartida, respostas do tipo Th2 ou regulatórias, com aumento da produção de citocinas, como IL-10, podem contribuir para a persistência fúngica e para a progressão da doença, resultando em pacientes com formas mais severas da doença (DA GLÓRIA SOUSA *et al.*, 2011; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017; SIQUEIRA *et al.*, 2017; PASSERO *et al.*, 2021).

Além disso, evidências sugerem que a via Th17 também pode desempenhar papel relevante na defesa contra fungos demáceos, promovendo o recrutamento de neutrófilos e a amplificação da resposta inflamatória local, enquanto o INF- γ secretado por Th1 ativa os neutrófilos e aumenta a fagocitose dos fungos. No entanto, na CBM, a resposta imune

frequentemente não é suficientemente eficaz para eliminar o patógeno, resultando em inflamação crônica persistente (DA GLÓRIA SOUSA *et al.*, 2011; SIQUEIRA *et al.*, 2020).

Dessa forma, a compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos na CBM reforça a necessidade de estratégias terapêuticas que não se limitem à ação antifúngica direta, mas que também promovam modulação da resposta imune local, como o imunomodulador IMQ. Nesse contexto, o uso de agentes imunomoduladores surge como alternativa racional, especialmente quando associado a sistemas farmacêuticos capazes de direcionar o fármaco ao sítio da infecção (BELDA; CRIADO; PASSERO, 2020; DE SOUSA *et al.*, 2014; LOGAN *et al.*, 2023).

3.2.3 Tratamento da Cromoblastomicose

O tratamento da CBM depende inicialmente de um diagnóstico clínico e micológico preciso, incluindo identificação do agente etiológico, extensão da lesão, tempo de evolução e presença de comorbidades do paciente. A escolha terapêutica deve considerar ainda fatores como localização anatômica, profundidade da lesão e resposta inflamatória local (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2021). O objetivo do tratamento é promover a erradicação do fungo, reduzir a carga inflamatória e evitar progressão para complicações, como infecções bacterianas secundárias e transformação neoplásica.

A CBM representa um desafio terapêutico devido ao seu caráter recalcitrante, sobretudo nas formas clínicas mais severas. Apesar da ausência de um tratamento de escolha bem estabelecido, diferentes abordagens terapêuticas vêm sendo empregadas, que envolvem tratamentos físicos, farmacológicos e a combinação de ambos (ANDRADE *et al.*, 2020; DE BRITO; BITTENCOURT, 2018; LOGAN *et al.*, 2023).

A base do tratamento da CBM consiste, tradicionalmente, na terapia antifúngica sistêmica. Entre os fármacos de primeira linha destacam-se o itraconazol e a TBF, utilizados isoladamente ou em associação, especialmente em casos extensos ou refratários (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017; PASSERO *et al.*, 2021).

O itraconazol, administrado em doses que variam entre 200 e 400 mg/dia, é amplamente empregado devido à sua atividade contra fungos demáceos. Entretanto, a resposta clínica costuma ser lenta e requer tratamento prolongado, frequentemente por meses ou anos (ANDRADE *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2021).

A TBF, por sua vez, atua por meio da inibição da enzima esqualeno epoxidase, interferindo na síntese de ergosterol e promovendo efeito fungicida direto (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017). As doses diárias utilizadas vão de 250 a 500 mg/dia. Embora eficaz em muitos

casos, também exige terapias prolongadas e pode estar associada a efeitos adversos hepáticos e gastrointestinais (PASSERO *et al.*, 2021).

Outras opções antifúngicas incluem o posaconazol e o voriconazol, especialmente em casos graves ou refratários, embora seu uso seja limitado pelo custo elevado e menor disponibilidade em regiões endêmicas (DA SILVA HELLWIG *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2021). A anfotericina B, principalmente em formulações lipídicas, pode ser indicada em formas disseminadas, mas sua toxicidade sistêmica limita o uso prolongado (DA SILVA HELLWIG *et al.*, 2019; PASSERO *et al.*, 2021).

Além da terapia farmacológica sistêmica, abordagens físicas também são empregadas como estratégias complementares. A crioterapia com nitrogênio líquido é amplamente utilizada em lesões localizadas e pode ser associada à terapia antifúngica para potencializar a resposta clínica (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017). A termoterapia e a excisão cirúrgica também são indicadas em casos selecionados, particularmente quando há lesões bem delimitadas (SANTOS *et al.*, 2021). Entretanto, essas abordagens apresentam limitações quanto à extensão e profundidade das lesões, além do risco de cicatrizes e recidiva.

A TBF apresenta MIC $\leq 0,5$ $\mu\text{g/mL}$ para *Fonsecaea pedrosoi*, indicando elevada potência antifúngica. Entretanto, para que essa atividade seja efetiva no tratamento da CBM, é necessário que o sistema de liberação seja capaz de promover concentrações no tecido superiores a esse valor, especialmente na derme, local de instalação do fungo (DA SILVA HELLWIG *et al.*, 2019; SMITH *et al.*, 2025).

Apesar das múltiplas estratégias disponíveis, a CBM apresenta difícil manejo. O tratamento é prolongado, com taxas variáveis de resposta clínica e recidivas frequentes, mesmo após aparente resolução das lesões (PASSERO *et al.*, 2021). A persistência de estruturas muriformes viáveis no tecido e a modulação inadequada da resposta imune celular contribuem para a cronicidade da infecção (DA GLÓRIA SOUSA *et al.*, 2011).

Nesse contexto, estratégias adjuvantes que envolvem modulação da resposta imune têm sido investigadas. O IMQ, agonista dos receptores Toll-like 7, demonstrou potencial para restaurar a ativação imunológica local, favorecendo a resposta do tipo Th1 e contribuindo para a regressão das lesões quando utilizado como terapia complementar à antifúngica sistêmica (BELDA *et al.*, 2023; DE SOUSA *et al.*, 2014; LOGAN *et al.*, 2023).

De modo geral, as terapias convencionais para CBM estão associadas a tratamentos prolongados, o que pode favorecer o desenvolvimento de resistência quando não conduzidas de forma adequada. Além disso, o uso sistêmico por longos períodos aumenta o risco de efeitos

adversos, como hepatotoxicidade e reações gastrointestinais, o que pode comprometer a adesão ao tratamento. Há também o elevado custo terapêutico em determinadas regiões endêmicas, o que representa um desafio adicional para o manejo da doença (SANTOS *et al.*, 2021). Além disso, as características estruturais das lesões, como hiperqueratose acentuada e fibrose, podem dificultar a penetração adequada de agentes terapêuticos, comprometendo a eficácia das abordagens tópicas convencionais (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017).

Atualmente não há tratamento tópico estabelecido ou aprovado para a CBM. As terapias convencionais baseiam-se exclusivamente na administração sistêmica prolongada, o que implica riscos de toxicidade hepática, interações medicamentosas e baixa adesão ao tratamento. Essa lacuna terapêutica reforça a necessidade de desenvolver sistemas farmacêuticos de administração tópica capazes de promover a concentração local dos ativos, com menor exposição sistêmica.

3.2.4 Cloridrato de Terbinafina

A TBF é um antifúngico pertencente à classe das alilaminas, amplamente utilizado no tratamento de dermatomicoses, onicomioses e infecções cutâneas causadas por dermatófitos, leveduras e alguns fungos filamentosos (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017). No contexto da CBM, a TBF é empregada principalmente por via oral, isoladamente ou em associação com itraconazol, especialmente em casos de lesões extensas ou refratárias (PASSERO *et al.*, 2021; SANTOS *et al.*, 2021).

Seu potencial terapêutico está relacionado ao mecanismo fungicida direto, que ocorre por meio da inibição da enzima esqualeno epoxidase, etapa inicial da biossíntese do ergosterol, componente essencial da membrana fúngica. A inibição dessa via promove o acúmulo intracelular de esqualeno, substância tóxica para o fungo, levando à desorganização da membrana celular e à morte fúngica (HALAT; YOUNES; RAHAL, 2022; RYDER, 1992).

Embora eficaz, o tratamento sistêmico da CBM com TBF pode exigir longos períodos terapêuticos, frequentemente superiores a 6 meses, podendo chegar a 12 meses, com risco de recidiva após suspensão da medicação (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017; PASSERO *et al.*, 2021). Além disso, o uso prolongado pode estar associado a efeitos adversos hepáticos e interações medicamentosas, reforçando o interesse em estratégias tópicas que promovam maior concentração local e menor exposição sistêmica.

A TBF possui fórmula molecular $C_{21}H_{25}N \cdot HCl$ e peso molecular de 327,90 g/mol (Figura 5). O grupamento amina fornece a molécula caráter básico e apresenta pKa 7,1. Além disso, apresenta log P aproximado de 5,5, característica que evidencia sua natureza altamente

lipofílica e justifica sua elevada afinidade por tecidos queratinizados (SACHDEVA *et al.*, 2010).

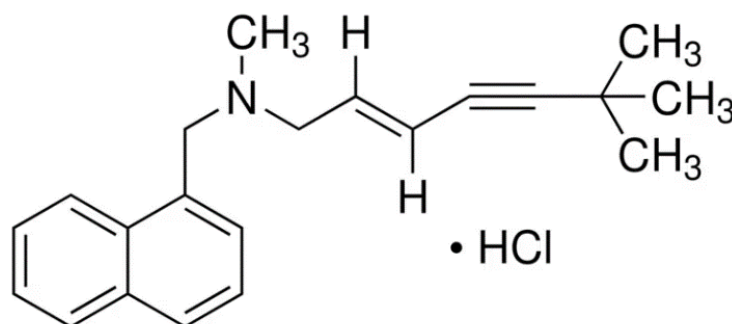


Figura 5. Fórmula estrutural do cloridrato de terbinafina. Fonte: Kanakapura; Penmatsa, 2016.

Seu ponto de fusão situa-se entre 203–205 °C. A molécula apresenta baixa solubilidade em água (0,73 µg/mL), sendo mais solúvel em solventes orgânicos como etanol e metanol, o que impõe desafios para o desenvolvimento de formulações hidrofílicas (KANAKAPURA; PENMATSA, 2016; KHAN *et al.*, 2014; KUMINEK *et al.*, 2013).

A elevada lipofilicidade favorece sua penetração em camadas ricas em lipídios, como o EC, porém, pode limitar sua difusão homogênea em sistemas aquosos e comprometer sua biodisponibilidade quando incorporada em veículos convencionais (TUNCAY TANRIVERDI *et al.*, 2015). A TBF apresenta alta ligação a proteínas plasmáticas (> 99%) e extensa metabolização hepática, sendo eliminada predominantemente na forma de metabólitos (PASSERO *et al.*, 2021; TUNCAY TANRIVERDI *et al.*, 2015). Essas características reforçam a importância de estratégias que priorizem retenção cutânea e minimizem absorção sistêmica.

3.2.5 Imiquimode

O IMQ é um imunomodulador sintético pertencente à classe das imidazoquinolinas, utilizado principalmente no tratamento de verrugas genitais, carcinoma basocelular superficial e ceratose actínica (SCHÖN; SCHÖN, 2007)

Seu uso na CBM surgiu a partir de evidências que demonstraram que a doença está associada a falhas na ativação da resposta imune celular, especialmente na via Th1 (DA GLÓRIA SOUSA *et al.*, 2011). Estudos demonstraram que a aplicação tópica de IMQ pode restaurar a ativação imune local, favorecendo regressão das lesões quando utilizado como terapia adjuvante à antifúngica convencional (BELDA; CRIADO; PASSERO, 2020; DA GLÓRIA SOUSA *et al.*, 2011; DE SOUSA *et al.*, 2014; LOGAN *et al.*, 2023).

O mecanismo de ação do IMQ baseia-se na ativação dos receptores Toll-like 7 (TLR-7), desencadeando uma cascata de sinalização intracelular que promove a produção de citocinas, como interferon- α , interferon- γ e IL-12. A secreção dessas citocinas favorece o desenvolvimento de uma resposta imune do tipo Th1, com ativação de linfócitos T, macrófagos e células de Langerhans (ALGAHTANI *et al.*, 2020; SCHÖN; SCHÖN, 2007). Diferentemente da TBF, o IMQ não possui atividade antifúngica direta, mas atua modulando o microambiente imunológico da lesão.

O IMQ apresenta fórmula molecular $C_{14}H_{16}N_4$ e peso molecular de 240,30 g/mol (Figura 6). Possui caráter básico fraco, com pKa em torno de 7,3, e log P aproximado de 2,7–3,0, indicando natureza lipofílica moderada (TELÓ *et al.*, 2017).

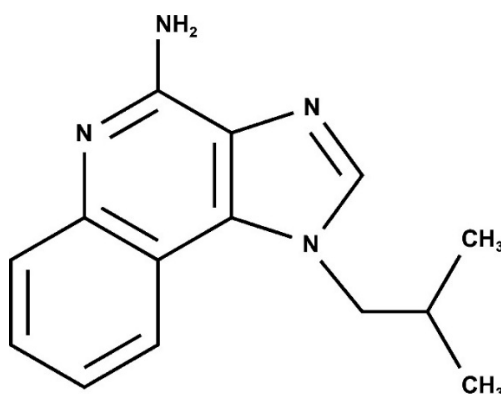


Figura 6. Fórmula estrutural do imiquimode. Fonte: Argenziano *et al.*, 2019.

É praticamente insolúvel em água (18 $\mu\text{g/mL}$), apresentando maior solubilidade em solventes orgânicos, característica que limita sua biodisponibilidade tópica quando formulado em sistemas convencionais (ALVAREZ-FIGUEROA *et al.*, 2020; KIM *et al.*, 2023). Comercialmente, é disponibilizado em formulação creme a 5%, cuja eficácia depende do tempo de contato com a pele e da permeação adequada pelo EC. Sua liberação cutânea depende fortemente da composição do veículo e sistemas poliméricos estruturados podem promover liberação sustentada e maior retenção dérmica quando comparados às formulações tradicionais (KIM *et al.*, 2023).

Farmacocineticamente, a absorção sistêmica após aplicação tópica é baixa ($< 1\%$), sendo que a maior parte é metabolizada localmente ou eliminada via renal (SCHÖN; SCHÖN, 2007), o que reforça sua segurança para uso dermatológico.

3.2.6 Associação do Imiquimode e do Cloridrato de Terbinafina

A escolha da TBF e do IMQ neste trabalho fundamenta-se na complementaridade de seus mecanismos de ação frente à fisiopatologia da CBM. A doença caracteriza-se por infecção fúngica crônica associada à persistência do patógeno no tecido e à disfunção da resposta imune celular do hospedeiro (DA GLÓRIA SOUSA *et al.*, 2011; PASSERO *et al.*, 2021). Assim, estratégias terapêuticas que atuem exclusivamente sobre o fungo podem não ser suficientes para promover erradicação completa da infecção, particularmente em lesões de longa evolução.

A TBF exerce ação antifúngica direta por meio da inibição da enzima esqualeno epoxidase, etapa essencial da biossíntese do ergosterol, promovendo acúmulo intracelular de esqualeno e desorganização da membrana celular fúngica (KHAN *et al.*, 2014). Trata-se de fármaco amplamente utilizado na prática clínica para o tratamento da CBM isoladamente ou em associação com outros antifúngicos, sobretudo em casos extensos ou refratários (SANTOS *et al.*, 2021). Entretanto, mesmo diante da redução da carga fúngica, a persistência de estruturas muriformes viáveis pode ocorrer quando a resposta imune local permanece inadequada (SIQUEIRA *et al.*, 2017).

O IMQ, por sua vez, não possui atividade antifúngica direta. Sua relevância terapêutica reside na capacidade de modular a resposta imune por meio da ativação dos receptores Toll-like 7, desencadeando sinalização dependente de MyD88 e promovendo produção de citocinas associadas à polarização Th1, como interferon- α , interferon- γ e IL-12 (HANNA; ABADI; ABBAS, 2016; SCHÖN; SCHÖN, 2007). Diante disso, a restauração da ativação imune local pode favorecer regressão das lesões quando o IMQ é utilizado como terapia adjuvante ao tratamento antifúngico convencional (DE SOUSA *et al.*, 2014; LOGAN *et al.*, 2023).

Nesse contexto, a atuação antifúngica direta pode reduzir o estímulo antigênico persistente, enquanto a ativação imunológica promovida pelo IMQ pode favorecer a eliminação de estruturas residuais e contribuir para a redução de recidivas (DA GLÓRIA SOUSA *et al.*, 2011; PASSERO *et al.*, 2021).

3.3 FILMES COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO

Apesar da eficácia antifúngica da TBF e do potencial imunomodulador do IMQ, características físico-químicas como baixa solubilidade aquosa, elevada lipofilicidade e dependência do veículo podem limitar a biodisponibilidade tópica desses fármacos quando incorporados em formulações convencionais (KHAN *et al.*, 2014; TELÓ *et al.*, 2017). Além disso, no contexto da CBM, as alterações estruturais das lesões, como hiperqueratose, fibrose e

irregularidade superficial, podem comprometer a retenção e a distribuição homogênea de sistemas semissólidos tradicionais, como cremes e pomadas (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2021).

Essa condição justifica a busca por sistemas de liberação capazes de promover maior tempo de contato com o tecido, controle da taxa de liberação e melhor retenção local do fármaco. Entre essas estratégias, os filmes poliméricos bioadesivos destacam-se como alternativa promissora para administração tópica de ativos com características lipofílicas (TOLENTINO *et al.*, 2024).

Os filmes são sistemas farmacêuticos constituídos por uma matriz polimérica capaz de incorporar o fármaco de forma dispersa ou solubilizada e, após aplicação, formar uma película contínua sobre a superfície biológica. Essa matriz atua como reservatório externo, promovendo liberação controlada do ativo por mecanismos predominantemente difusionais e, em sistemas hidrofílicos, também por intumescimento e relaxamento da rede polimérica (DONNELLY *et al.*, 2006; RAMINENI *et al.*, 2013; TOLENTINO *et al.*, 2024; TUNCAY TANRIVERDI *et al.*, 2015).

A adesão desses sistemas à superfície biológica ocorre por meio de interações físico-químicas entre o polímero e o tecido. Embora o conceito de mucoadesão esteja tradicionalmente relacionado a mucosas, os princípios de bioadesão também se aplicam à superfície cutânea, especialmente quando há presença de umidade residual ou exsudato na lesão. A bioadesão pode ocorrer por ligações iônicas, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas ou forças de van der Waals, dependendo da natureza do polímero e do substrato biológico (SMART, 2005; KHUTORYANSKIY, 2011).

De maneira geral, o processo de bioadesão ocorre em duas etapas principais: uma fase inicial de contato, em que há aproximação íntima entre o filme e o tecido, e uma fase de consolidação, em que as interações físico-químicas se estabilizam, promovendo adesão prolongada. O equilíbrio adequado de hidratação é fundamental nesse processo, uma vez que hidratação insuficiente pode comprometer a interpenetração das cadeias poliméricas, enquanto hidratação excessiva pode levar à formação de superfície escorregadia e redução da força adesiva (GUPTA, 2020; SMART, 2005).

Além da bioadesão, o desempenho de um filme como sistema de liberação depende de propriedades estruturais da matriz polimérica. O grau de intumescimento influencia a difusão do fármaco no interior da rede polimérica, enquanto parâmetros como espessura, resistência mecânica, flexibilidade e transparência determinam a aplicabilidade clínica do sistema.

Plastificantes são frequentemente utilizados para modular propriedades mecânicas, reduzindo fragilidade e aumentando elasticidade, aspectos relevantes para aplicação em áreas anatômicas móveis (AMARAL *et al.*, 2024; YOSHIDA; OLIVEIRA JUNIOR; FRANCO, 2008).

Outra vantagem relevante dos filmes é a possibilidade de incorporação simultânea de múltiplos fármacos em uma única matriz, permitindo estratégias combinadas de liberação. A matriz polimérica pode atuar como meio dispersante para fármacos lipofílicos, promovendo distribuição homogênea no sistema (AMARAL *et al.*, 2024; DONNELLY *et al.*, 2006; RAMINENI *et al.*, 2013). Essa característica é particularmente importante quando se considera a associação entre TBF e IMQ, cujas propriedades físico-químicas demandam um ambiente controlado para a manutenção da estabilidade e da eficácia.

Dessa forma, os filmes poliméricos bioadesivos configuram-se como sistemas de liberação tecnologicamente adequados para administração cutânea de fármacos destinados ao tratamento da CBM, uma vez que permitem integrar retenção local, controle de liberação e adaptação às características estruturais das lesões, contribuindo potencialmente para otimização da resposta terapêutica.

Evidencia-se, na literatura, uma lacuna significativa no que se refere ao desenvolvimento de filmes poliméricos voltados especificamente ao tratamento da cromoblastomicose. Até o momento, não foram identificadas abordagens que integrem, em um único sistema, a associação entre um agente antifúngico e um modulador da resposta imune, o que pode ser promissor diante da complexidade fisiopatológica dessa micose subcutânea. Dessa forma, a proposta do presente trabalho configura-se como uma alternativa inovadora ao explorar a interação complementar entre esses dois mecanismos terapêuticos em um sistema de liberação tópica baseado em filme polimérico.

3.3.1 Quitosana

A quitosana é um polímero natural amplamente estudado na preparação de filmes bioadesivos e sistemas de liberação controlada de fármacos (TOLENTINO *et al.*, 2024; YOSHIDA; OLIVEIRA JUNIOR; FRANCO, 2008). Trata-se de um polissacarídeo catiônico obtido a partir da N-desacetilação parcial da quitina, substância estrutural presente no exoesqueleto de crustáceos, insetos e na parede celular de fungos (Figura 7). Sua estrutura é composta por unidades repetidas de D-glicosamina e N-acetil-D-glicosamina, ligadas por ligações β -(1 $\rightarrow$ 4), sendo o grau de desacetilação um dos principais determinantes de suas propriedades físico-químicas e tecnológicas (AYCAN; YAYLA; AYDIN, 2020).

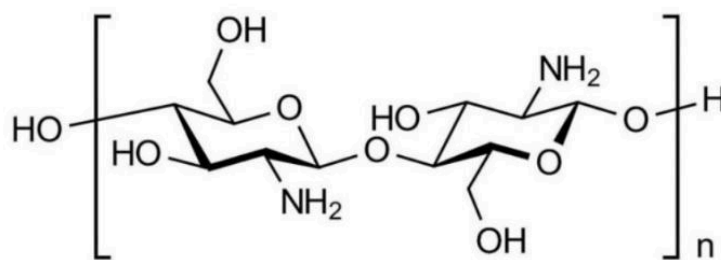


Figura 7. Fórmula estrutural da quitosana. Fonte: Aycan; Yayla; Aydin, 2020.

O caráter catiônico da quitosana decorre da presença de grupos amina livres ($-NH_2$), que se encontram protonados em meio ácido. Essa característica confere ao polímero solubilidade em soluções levemente ácidas e elevada capacidade de interação eletrostática com superfícies biológicas carregadas negativamente, como proteínas do EC e mucinas. Além disso, a presença de grupos hidroxila e amina favorece a formação de ligações de hidrogênio, contribuindo para a formação de redes poliméricas estáveis, fundamentais para a obtenção de filmes com integridade estrutural adequada (ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009; ARANAZ *et al.*, 2009).

A quitosana apresenta biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade, características que a tornam interessante para aplicações farmacêuticas tópicas (ARANAZ *et al.*, 2009; PATEL; PRAJAPATI; PATEL, 2007). Suas propriedades formadoras de filme são amplamente exploradas no desenvolvimento de matrizes poliméricas capazes de carrear fármacos e promover liberação sustentada. O mecanismo de liberação geralmente está associado à difusão do ativo através da matriz hidratada e ao intumescimento progressivo do polímero, fenômenos que influenciam diretamente o perfil cinético do sistema.

Outro aspecto relevante é o potencial da quitosana em aumentar a permeação cutânea. Estudos indicam que o polímero pode modificar temporariamente a organização da barreira epitelial e favorecer a difusão de moléculas incorporadas à matriz (ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009; PATEL; PRAJAPATI; PATEL, 2007). Essa propriedade assume especial importância em condições patológicas caracterizadas por hiperqueratose e alterações estruturais da pele, como ocorre nas lesões típicas da CBM, nas quais a penetração de fármacos representa um desafio terapêutico significativo.

Apesar das inúmeras vantagens, filmes produzidos exclusivamente com quitosana podem apresentar limitações mecânicas, como baixa resistência à tração e fragilidade estrutural após secagem (AYCAN; YAYLA; AYDIN, 2020). Dessa forma, a associação com outros polímeros e plastificantes é necessária, visando melhorar propriedades como flexibilidade, resistência mecânica e estabilidade dimensional (KANATT *et al.*, 2012). Essa estratégia é

fundamental para garantir que o filme apresente adequada adesividade cutânea, conforto ao paciente e integridade estrutural durante todo o período de aplicação.

Além das características bioadesivas e formadoras de filme, as propriedades da quitosana podem ser moduladas por meio do controle do grau de desacetilação, do peso molecular e da composição da blenda polimérica. Esses parâmetros influenciam diretamente a hidratação do sistema, o comportamento de intumescimento e a cinética de liberação dos fármacos incorporados, aspectos determinantes para o desempenho terapêutico do filme desenvolvido (ARANAZ *et al.*, 2009; KANATT *et al.*, 2012).

Considerando que o tratamento tópico da CBM exige tanto a adequada solubilização dos fármacos na matriz quanto a superação da barreira imposta pelo EC, a associação da quitosana com agentes promotores de permeação constitui uma estratégia racional. Nesse sentido, ácidos graxos insaturados, como o ácido oleico, têm sido amplamente descritos como promotores de permeação e agentes solubilizantes em formulações dermatológicas (PETROVÁ *et al.*, 2023; PESCHINA *et al.*, 2018; TELÓ *et al.*, 2017) podendo potencializar a difusão do IMQ e da TBF a partir do filme polimérico até as camadas mais profundas da pele acometida.

3.3.2 Ácido Oleico

O ácido oleico (ácido cis-9-octadecenoico) é um ácido graxo monoinsaturado de cadeia longa, contendo 18 átomos de carbono e uma dupla ligação em configuração cis na posição 9 (Figura 8). Essa insaturação confere à molécula uma conformação estrutural “dobrada”, responsável por sua capacidade de desorganizar arranjos lipídicos altamente organizados, como aqueles presentes no EC (TELÓ *et al.*, 2017).

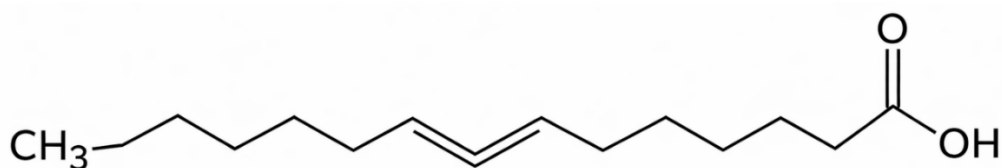


Figura 8. Fórmula estrutural do ácido oleico. Fonte: Teló *et al.*, 2017.

O ácido oleico apresenta caráter lipofílico e elevada afinidade por fármacos pouco solúveis em água, favorecendo sua solubilização em sistemas poliméricos. Essa propriedade é particularmente relevante para moléculas como a TBF e o IMQ, que apresentam baixa

solubilidade aquosa e perfil predominantemente lipofílico (PETROVÁ *et al.*, 2023; PESCINA *et al.*, 2018).

A incorporação do ácido oleico pode atuar como microambiente lipídico na matriz do filme, contribuindo para a manutenção do fármaco em estado solubilizado ou molecularmente disperso (KIM *et al.*, 2023). Além da função solubilizante, o ácido oleico é reconhecido como um dos promotores de permeação cutânea mais eficazes descritos na literatura. Seu mecanismo de ação envolve a inserção da cadeia lipídica nas lamelas intercelulares do EC, promovendo desorganização temporária da matriz lipídica composta principalmente por ceramidas, colesterol e ácidos graxos livres. Essa perturbação aumenta a fluidez lipídica e cria domínios de descontinuidade que favorecem a difusão de moléculas lipofílicas através da via intercelular (KIM *et al.*, 2023; GHEZZI *et al.*, 2021; PESCINA *et al.*, 2018; TELÓ *et al.*, 2017).

Outro aspecto importante refere-se à interação do ácido oleico com sistemas poliméricos. Em matrizes à base de quitosana, a presença de um componente lipofílico pode modificar propriedades mecânicas, grau de intumescimento e perfil de liberação, atuando como plastificante secundário e modulador da difusão do fármaco. A proporção empregada influencia diretamente a organização da rede polimérica e, consequentemente, o comportamento de liberação do sistema (AYCAN; YAYLA; AYDIN, 2020; GHEZZI *et al.*, 2021; PESCINA *et al.*, 2018).

No contexto da CBM, em que as lesões apresentam alterações estruturais como hiperqueratose e fibrose dérmica, a simples aplicação de fármacos tópicos convencionais pode não ser suficiente para garantir adequada penetração no tecido infectado. Assim, a inclusão de um promotor de permeação como o ácido oleico representa uma estratégia racional para aumentar o fluxo cutâneo dos fármacos e potencializar sua disponibilidade local (DE SOUSA *et al.*, 2014; BELDA *et al.*, 2023; GHEZZI *et al.*, 2021; TELÓ *et al.*, 2017).

Dessa forma, o uso do ácido oleico na formulação dos filmes bioadesivos não se limita à função de excipiente, mas integra uma estratégia direcionada à melhoria simultânea da solubilização e da permeação cutânea dos fármacos incorporados. Essa abordagem contribui para a construção de um sistema de liberação mais eficiente, capaz de superar parcialmente as barreiras impostas pela fisiopatologia da doença e pela própria estrutura da pele.

Embora os antifúngicos sistêmicos, como a TBF, representem a base terapêutica atual, sua utilização está associada a longos períodos de administração e a potenciais efeitos adversos. Por outro lado, o IMQ surge como uma estratégia complementar ao atuar na modulação da resposta imune local, favorecendo o controle da infecção. Nesse contexto, a associação de um

antifúngico de ação direta e um imunomodulador, incorporados em um sistema farmacêutico capaz de promover maior tempo de residência, liberação controlada e potencial aumento da permeação cutânea, apresenta-se como uma abordagem racional e cientificamente fundamentada (BELDA *et al.*, 2023).

Assim, o desenvolvimento de filmes bioadesivos à base de quitosana, associados a agentes promotores da permeação, como o ácido oleico, configura-se como uma alternativa promissora para superar as limitações terapêuticas atuais e contribuir para uma estratégia tópica mais segura e eficaz no tratamento da CBM.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Reagentes e Insumos

O cloridrato de terbinafina ($\geq 99,0\%$), o imiquimode ($\geq 99,0\%$), o ácido fórmico e o ácido oleico foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). A acetonitrila e o metanol de grau HPLC foram obtidos da J.T. Baker (Phillipsburg, PA, EUA). O dimetilsulfóxido foi adquirido da Dinâmica Química Contemporânea Ltda. (São Paulo, Brasil).

Para a preparação dos tampões, foram utilizados fosfato de sódio dibásico e fosfato de sódio monobásico, fornecidos pela Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Ácido clorídrico (HCl), hidróxido de sódio (NaOH), ácido acético glacial e Tween[®]80 foram obtidos da Dinâmica Química Contemporânea Ltda. (São Paulo, Brasil). O acetato de sódio foi adquirido da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha).

Para o preparo dos filmes, foram utilizados álcool polivinílico (PVA, 87-90% hidrolisado), quitosana de médio peso molecular (PM = 19-310 kDa, grau de desacetilação 75-85%), Poloxamer[®]400 e ácido oleico, todos provenientes da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). A glicerina foi adquirida da ACS Científica (Sumaré, Brasil) e o propilenoglicol da Dinâmica Química Contemporânea Ltda. (São Paulo, Brasil). Para o ensaio de bioadesividade, utilizou-se mucina da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Filtros de 0,45 μ m, hidrofóbicos e hidrofílicos, foram adquiridos de Analítica (São Paulo, Brasil). A membrana hidrofílica de acetato de celulose utilizada nos ensaios de liberação (Dialysis Tubing, MWCO 12.000-14.000, Fisherbrand) foi obtida da Fisher Scientific (Reino Unido). A técnica de *tape-stripping* foi realizada com fita adesiva *Scotch[®] 845 Book Tape* (3M, St. Paul, EUA).

A água utilizada em todas as análises e preparo de formulação era ultrapura, obtida por meio de um sistema Millipore (Illkirch-Graffenstaden, França).

4.1.2 Pele

4.1.2.1 Obtenção da Pele de Suínos

As orelhas dos suínos foram adquiridas no abatedouro Suíno Bom Alimentos (Ceilândia - DF, Brasil), imediatamente após o abate dos animais e antes do processo de escalda, sendo transportadas ao laboratório sob refrigeração. A pele inteira foi removida da região externa da orelha com auxílio de bisturi. Em seguida, os fragmentos de pele foram cuidadosamente separados das camadas adiposa e muscular, com o auxílio de tesoura. Após esse procedimento,

os fragmentos de pele foram limpos e os pelos da superfície foram aparados com auxílio de tesoura. Foram cortados discos de pele com área aproximada de 2 cm² e armazenados sob refrigeração (-4 °C) para utilização no prazo máximo de 1 mês após a coleta.

Antes dos experimentos de permeação cutânea, as amostras de pele foram descongeladas à temperatura ambiente e submetidas à reidratação em tampão fosfato (pH 7,4) por 15 minutos antes do uso.

4.1.2.2 Separação das Camadas da Pele

Foi realizada a técnica de *tape stripping* para separação do EC da PR. Para isso, fragmentos de pele com área de 2 cm² foram fixados em suporte de isopor, com o estrato córneo voltado para cima. Em seguida, foram aplicados e retirados, sucessivamente, 15 pedaços de fita adesiva para a remoção do EC. Após essa etapa, a pele remanescente (PR) foi cortada em pequenos pedaços com auxílio de tesoura.

Posteriormente, as diferentes camadas da pele foram acondicionadas em frascos de vidro individuais e protegidas da luz. Em seguida, foram adicionados 5 mL de metanol a cada frasco para extração dos fármacos. Os frascos foram mantidos sob agitação magnética a 500 rpm durante a noite (*overnight*) e, posteriormente, filtrados por membranas de 0,45 µm para análise (Figura 9).

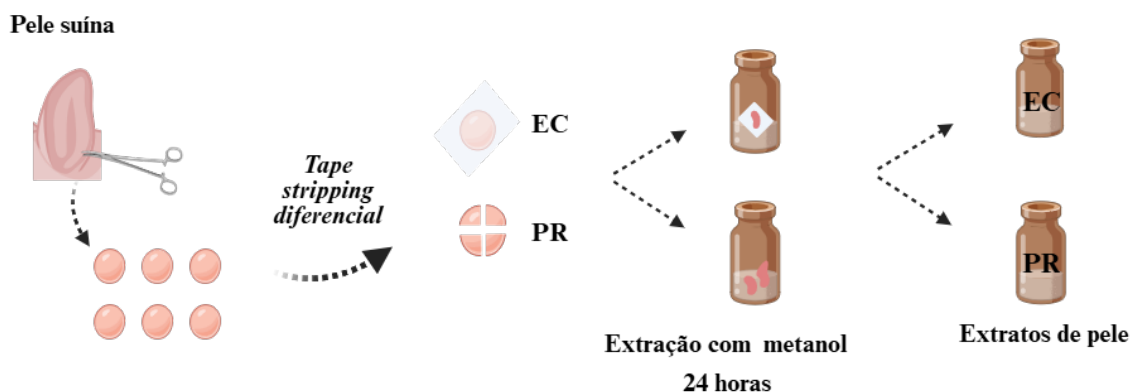


Figura 9. Esquema representativo do procedimento de separação das camadas da pele. O EC foi removido por *tape stripping*, enquanto a PR foi fragmentada em pequenos pedaços. Ambas as frações foram posteriormente submetidas à extração para quantificação. EC – Estrato córneo; PR – pele remanescente. Fonte: Autoria própria.

4.2 PREPARO DA SOLUÇÃO ESTOQUE PARA O DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO

Soluções estoques de IMQ e TBF foram preparadas na concentração de 100 µg/mL, pela pesagem de 5 mg do padrão analítico de cada fármaco, seguida de sua dissolução em 50 mL de metanol. As soluções nas demais concentrações foram obtidas por meio da diluição adequada

da solução estoque em metanol. Todas as amostras foram acondicionadas em frascos âmbar e armazenadas sob refrigeração até o momento da utilização.

4.3 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO

O desenvolvimento do método analítico foi conduzido com o objetivo de estabelecer condições cromatográficas adequadas para a determinação de IMQ e TBF. Inicialmente, os espectros de absorção na região do ultravioleta/visível (UV/Vis) dos fármacos foram obtidos individualmente a partir de suas respectivas soluções estoque, utilizando-se de um espectrofotômetro UV Shimadzu UV-1800 (Shimadzu, Kyoto, Japão). Com base nos espectros obtidos, foram selecionados os comprimentos de onda correspondentes aos máximos de absorção, empregados na detecção cromatográfica.

As análises foram realizadas em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), modelo Shimadzu LC-20AD, composto por duas bombas (modelo LC-20AT), um injetor automático (modelo SIL-20AD) e um forno de coluna (modelo CTO-20AS), acoplados a um detector espectrofotométrico DAD (modelo SPD-M20A) e a um detector de fluorescência (modelo RF-20A), controlados pelo software Shimadzu LC. A fase estacionária utilizada foi uma coluna de fase reversa C8 (LiChrospher® RP-Select B, 125 mm × 4,0 mm, 5 µm, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha).

Durante o desenvolvimento, diferentes condições analíticas foram avaliadas, como a composição e a vazão da fase móvel e a temperatura da coluna de separação. A seleção das condições mais adequadas baseou-se no desempenho cromatográfico dos analitos, considerando parâmetros como o fator de cauda e o número de pratos teóricos, determinados pelo software do equipamento.

Os testes iniciais foram realizados com soluções padrão de IMQ e TBF em metanol (100 µg/mL). As condições cromatográficas selecionadas também foram avaliadas na presença de possíveis interferentes provenientes dos estratos da pele, obtidos conforme descrito no item 2.3.2, a fim de verificar a seletividade do método. As condições otimizadas foram posteriormente empregadas nos ensaios de validação analítica e na quantificação das amostras experimentais.

4.3.1 Condições Cromatográficas

Após a etapa de desenvolvimento, definiu-se um método cromatográfico com eluição isocrática, utilizando uma fase móvel composta por água contendo 0,1% (v/v) de ácido fórmico e metanol contendo 0,1% (v/v) de ácido fórmico, na proporção 60:40 (v/v). A vazão foi ajustada

para 0,8 mL/minuto e o volume de injeção de cada amostra foi de 5 µL. A temperatura do forno da coluna foi mantida em 40 °C durante as análises. A detecção foi realizada tanto por absorção no UV, a 244 nm, quanto por fluorescência, com comprimentos de onda de excitação e emissão de 236 nm e 340 nm, respectivamente. Entretanto, a quantificação foi realizada por detecção por fluorescência, em razão de sua maior sensibilidade em comparação à detecção por absorção UV.

4.3.2 Validação do Método Analítico

O método foi validado em conformidade com as diretrizes estabelecidas pela *International Council for Harmonisation* (ICH), conforme ICH Q2(R2) (ICH, 2023), e pela RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2017). Foram avaliados os parâmetros de seletividade, considerando possíveis interferentes biológicos e produtos de degradação dos fármacos, bem como a linearidade, o limite de detecção (LD), o limite de quantificação (LQ), a precisão e a exatidão.

4.3.2.1 Seletividade

Soluções padrão de IMQ e TBF nas concentrações de 0,5 µg/mL e 1,0 µg/mL, respectivamente, foram analisadas isoladamente (branco) e na presença dos possíveis interferentes do método. Os interferentes avaliados incluíram extratos provenientes da pele (obtidos conforme descrito na Seção 4.2), tampão acetato de sódio pH 4,0 e o branco do filme (formulação sem adição de fármacos, preparadas conforme será descrito a seguir no item 4.8.1). O objetivo desse ensaio foi verificar a ausência de interferência no tempo de retenção e na área dos picos cromatográficos de IMQ e TBF, garantindo que os componentes da matriz biológica, do meio receptor e da formulação não coelúissem nem comprometessem a quantificação dos analitos. Todos os ensaios foram realizados em sextuplicata ($n = 6$).

Os dados quantitativos, expressos como área do pico e tempo de retenção, foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão do sinal obtido das seis réplicas. Diferenças estatisticamente significativas entre os conjuntos de dados foram avaliadas por meio de análise de variância (ANOVA), seguida do teste de comparações múltiplas de *Tukey*, com nível de significância de $p \leq 0,05$.

4.3.2.2 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada por meio da construção de curvas analíticas, preparadas em triplicata para cada nível de concentração, a partir das soluções estoque de IMQ

e TBF em metanol (100 µg/mL). A partir dessas soluções, foram preparadas três curvas de calibração nas seguintes faixas de concentração: 0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 0,8 e 1,0 µg/mL para IMQ e 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5 e 2,0 µg/mL para TBF.

A regressão linear foi realizada a partir do gráfico da concentração *versus* a área de pico cromatográfico, obtendo-se a equação do tipo $y = ax + b$, em que (a) corresponde ao coeficiente angular e (b) ao coeficiente linear. A linearidade foi avaliada pelo coeficiente de correlação linear (r), adotando-se como critério mínimo aceitável o valor de 0,99 (ANVISA, 2017).

4.3.2.3 Limites de Detecção e Quantificação

O limite de detecção (LD) é a menor concentração de analito em uma amostra que pode ser detectada, embora não necessariamente quantificada. O limite de quantificação (LQ) é definido como a menor concentração de analito que pode ser quantificada com precisão (ANVISA, 2017). Os valores teóricos de LD e LQ para IMQ e TBF a serem detectadas e quantificadas foram calculados de acordo com as Equações (1) e (2):

$$LD = 3,3 \times \frac{\sigma}{S} \quad (1)$$

$$LQ = 10 \times \frac{\sigma}{S} \quad (2)$$

Onde σ corresponde ao desvio padrão dos valores de intercepção do eixo Y obtidos a partir das curvas analíticas, e o S representa o coeficiente angular da curva de calibração.

4.3.2.4 Precisão

A precisão do método foi determinada pela repetibilidade instrumental (precisão intra-dia) e pela precisão intermediária do equipamento (precisão inter-dia). A repetibilidade foi determinada com amostras em três concentrações distintas para cada analito. Para o IMQ, foram preparadas as seguintes concentrações: 0,05, 0,5 e 1,0 µg/mL. Para a TBF, foram preparadas as seguintes concentrações: 0,25, 1,0 e 2,0 µg/mL. O ensaio foi realizado em triplicata.

A precisão intermediária foi avaliada em dois dias diferentes (inter-dia), no mesmo equipamento, por analistas diferentes, nas mesmas concentrações que a repetibilidade. Os resultados de precisão foram expressos como coeficientes de variação (CV), calculados de acordo com a Equação (3):

$$CV (\%) = \left(\frac{\sigma}{média} \right) \times 100 \quad (3)$$

Onde CV corresponde ao coeficiente de variação; σ é o desvio padrão da média dos resultados obtidos; e média é a média das medidas em triplicata para cada concentração analisada.

4.3.2.5 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada em termos de porcentagem de recuperação de quantidades conhecidas de IMQ e TBF a partir de amostras biológicas (EC e PR). Para isso, a técnica de *tape stripping*, descrita no item 4.2, foi utilizada para separação das camadas da pele. Volumes conhecidos das soluções estoque dos fármacos (100 µg/mL) foram adicionados a cada frasco contendo as camadas da pele previamente separadas, em volume suficiente para atingir as seguintes concentrações após ressuspensão: IMQ (0,1; 0,5 e 1,0 µg/mL) e TBF (0,5; 1,0 e 2,0 µg/mL). Após a evaporação completa do solvente, foram adicionados 5 mL de metanol a cada frasco, que foram então submetidos à agitação magnética (500 rpm) durante a noite para garantir a extração dos fármacos. Após a etapa de extração, o conteúdo de cada frasco foi filtrado por membranas de 0,45 µm e analisado segundo o método analítico proposto por CLAE-FL. As análises foram realizadas em triplicata para cada camada da pele e para cada nível de concentração. A recuperação foi determinada pela razão entre a concentração mensurada e a concentração teórica dos fármacos, conforme a Equação (4).

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{\text{Concentração mensurada}}{\text{Concentração Teórica}} \right) \times 100 \quad (4)$$

4.4 SOLUBILIDADE DO IMQ E DA TBF

A solubilidade do IMQ e TBF foi determinada nos seguintes sistemas solventes: tampão fosfato pH 7,4 contendo 1%, 2,5 % e 5% de Tween[®]80; tampão fosfato pH 6,0 contendo 1%, 2,5% e 5% de Tween[®]80; tampão fosfato pH 5,5; tampão fosfato pH 5,5 contendo 1%, 2,5% e 5 % de Tween[®]80; tampão acetato de sódio pH 4,0; e tampão acetato de sódio pH 4,0 contendo 1%, 2,5% e com 5% de Tween[®]80. A escolha dos sistemas solventes testados foi realizada considerando o elevado log P dos fármacos, parâmetro que expressa quantitativamente a lipofilicidade (log P = 2,6 para o IMQ e log P = 5,5 para TBF) (JAMSHAD H. *et al.*, 2022; SACHDEVA *et al.*, 2010).

Para a determinação da solubilidade, 1 mL de cada sistema solvente foi transferido para frascos âmbar com tampa. Em seguida, adicionou-se quantidade excessiva de cada fármaco a cada sistema solvente, quantidade suficiente para formar corpo de fundo. Cada sistema foi mantido sob agitação constante por 15 minutos. As amostras permaneceram sob agitação orbital

a 700 rpm, à temperatura ambiente, por 48 horas, para atingir o equilíbrio de solubilidade. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 20 minutos. As alíquotas do sobrenadante foram então diluídas, filtradas por membranas de 0,45 µm e analisadas pelo método cromatográfico. O ensaio foi realizado em triplicata para cada sistema solvente avaliado e cada fármaco.

4.5 ESTABILIDADE DE IMQ E TBF NOS SOLVENTES

A estabilidade analítica do IMQ e da TBF foi avaliada por meio de determinações quantitativas em dois sistemas distintos armazenados sob duas condições: à temperatura ambiente (25 °C) e sob refrigeração (4 °C). A estabilidade de curta duração (24 h) foi investigada utilizando tampão acetato de sódio pH 4,0, enquanto a estabilidade de longa duração (30 dias) foi avaliada em metanol. As análises foram realizadas seguindo o método validado pela CLAE-FL, em triplicata, no tempo inicial e após 3, 6, 12 e 24 h do preparo das soluções. A estabilidade foi expressa como a porcentagem de IMQ e de TBF remanescentes em cada intervalo de tempo, em relação à concentração inicialmente determinada.

4.6 ESTUDO DE COMPATIBILIDADE ENTRE OS FÁRMACOS E EXCIPIENTES DO FILME

4.6.1 Preparo das amostras

Para o estudo de compatibilidade, foram realizadas análises individuais de cada componente da formulação (IMQ, TBF, quitosana, PVA, glicerina e ácido oleico) e de misturas físicas binárias entre os fármacos e cada excipiente. Além disso, foram analisados os filmes prontos, conforme descrito na Tabela 1. O estudo foi realizado por meio da análise termogravimétrica (TGA) e da calorimetria de varredura diferencial (DSC) das amostras.

Tabela 1. Composição das misturas físicas de IMQ, TBF e dos demais componentes dos filmes para a realização do estudo de compatibilidade. IMQ – imiquimode; TBF – cloridrato de terbinafina; F-C17 – filme contendo imiquimode e cloridrato de terbinafina com 1% de ácido oleico; F-C18 – filme contendo imiquimode e cloridrato de terbinafina com 2% de ácido oleico.

MISTURAS	COMPOSIÇÃO (% p/p)					
	IMQ	TBF	ÁCIDO OLEICO	GLICERINA	QUITOSANA	PVA
M1	50	50	-	-	-	-
M2	50	-	50	-	-	-
M3	50	-	-	50	-	-
M4	50	-	-	-	50	-
M5	50	-	-	-	-	50
M6	-	50	50	-	-	-
M7	-	50	-	50	-	-
M8	-	50	-	-	50	-
M9	-	50	-	-	-	50
M10	25	25	12,5	12,5	12,5	12,5
Filme (F-C17)	X	X	X	X	X	X
Filme (F-C18)	X	X	X	X	X	X

4.6.2 Análise termogravimétrica (TGA)

As análises térmicas diferenciais (DTA) e termogravimétricas (TGA) foram realizadas em um DTG-60H (Shimadzu®, Tóquio, Japão). Foram pesados 3 mg de cada amostra, que foram acondicionados em placas de platina e submetidos a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min, sob atmosfera de nitrogênio com vazão de 50 mL/min, em um intervalo de temperatura de 30 a 500 °C. Todas as medições foram realizadas com o auxílio do software TA-60 da Shimadzu®.

4.6.3 Calorimetria de varredura diferencial (DSC)

As análises de calorimetria de varredura diferencial (DSC) foram realizadas em um equipamento DSC-60 (Shimadzu®, Tóquio, Japão). 3 mg de cada amostra foram acondicionados em placas de alumínio e submetidos a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min, sob atmosfera de nitrogênio com vazão de 50 mL/min, em um intervalo de temperatura de 25 a 400 °C. Todas as medições térmicas foram realizadas com o software TA-60 da Shimadzu®.

4.6.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As análises de FTIR foram conduzidas em um espectrômetro Varian 640 FTIR (Agilent Technologies, Estados Unidos). Os espectros foram registrados na faixa espectral de 4000 a 600 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} .

4.6.5 Estudo de modelagem molecular para avaliação de interação entre IMQ e TBF

Inicialmente, foram determinadas as formas predominantes de ocorrência do IMQ e de TBF em condições fisiológicas ($\text{pH} = 7,4$ e $T = 310,15 \text{ K}$). Para essa etapa, utilizou-se o software Marvin Sketch (CSIZMADIA, 1999) para prever os estados de protonação mais prováveis nas condições estabelecidas. As espécies com maior população relativa foram selecionadas e submetidas à otimização geométrica com o método GFN2-xTB (BANNWARTH; EHLERT; GRIMME, 2019; BANNWARTH *et al.*, 2021).

Posteriormente, foram realizadas simulações de metadinâmica (LAIO; PARRINELLO, 2002) no ensemble NVT, com controle de temperatura a $310,15 \text{ K}$ por meio do termostato de Nosé–Hoover (EVANS; HOLIAN, 1985; HOOVER, 1985; NOSÉ, 1984;). A simulação foi conduzida em uma janela temporal de $2,5 \text{ ps}$, dividida em 5.000 passos, com incremento de $0,5 \text{ fs}$. O modelo de solvatação adotado foi esférico, com raio de $12,5 \text{ \AA}$, contendo uma molécula de IMQ, uma de TBF e 200 moléculas de água. O objetivo das simulações foi avaliar a possibilidade de interação entre os fármacos no equilíbrio, bem como suas interações com as moléculas do solvente. O sistema foi considerado eletricamente neutro, com multiplicidade de spin singleto.

O método GFN2-xTB foi empregado nas etapas de otimização e dinâmica molecular, por apresentar desempenho adequado na reprodução de geometrias e tendências energéticas comparáveis às obtidas por cálculos baseados na Teoria do Funcional da Densidade (DFT), com menor custo computacional (BANNWARTH; EHLERT; GRIMME, 2019). Todos os cálculos foram realizados no software ORCA, versão 6 (NEESE, 2025).

4.7 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES CONTENDO IMQ E TBF

4.7.1 Obtenção dos filmes

Os filmes poliméricos foram preparados a partir de dispersões aquosas utilizando a técnica de evaporação de solvente (*casting*). A etapa inicial de desenvolvimento consistiu na avaliação da influência da concentração de quitosana nas propriedades dos filmes. Foram preparadas formulações contendo $0,5\%$ e $1,0\%$ de quitosana (F-A1 e F-A2), mantendo-se a concentração de PVA fixa em 3% .

A quitosana foi solubilizada em solução aquosa de ácido acético a 1% , sob agitação magnética contínua por 24 horas, à temperatura ambiente. O PVA foi solubilizado separadamente em água purificada, sob agitação por 24 horas, até a completa dissolução. Após a solubilização, ambas as soluções foram centrifugadas a 4000 rpm por 25 minutos para

remoção de partículas não dissolvidas. A solução de PVA foi adicionada lentamente à solução de quitosana sob agitação magnética (500 rpm). Concomitantemente, foi adicionado o plastificante correspondente à dispersão sob agitação, mantendo-se o aquecimento a 40 °C por 20 minutos para homogeneização. Os fármacos previamente solubilizados no sistema selecionado foram incorporados à matriz sob agitação a 500 rpm, a 40 °C, por 20 minutos. A massa final foi ajustada com água purificada até 24 g. A dispersão foi mantida em repouso por 30 minutos para eliminação de bolhas de ar. Após esse período, foi vertido 1,81 g da solução do filme em placas de Petri de 12 poços com 3,85 cm de diâmetro. A secagem foi realizada em estufa a 40 °C por 24 horas, até a completa evaporação do solvente e formação de filmes contínuos. Após a secagem, os filmes foram cuidadosamente desmoldados e submetidos à avaliação inicial macroscópica. Posteriormente, armazenados em dessecador até as análises subsequentes (Figura 10).

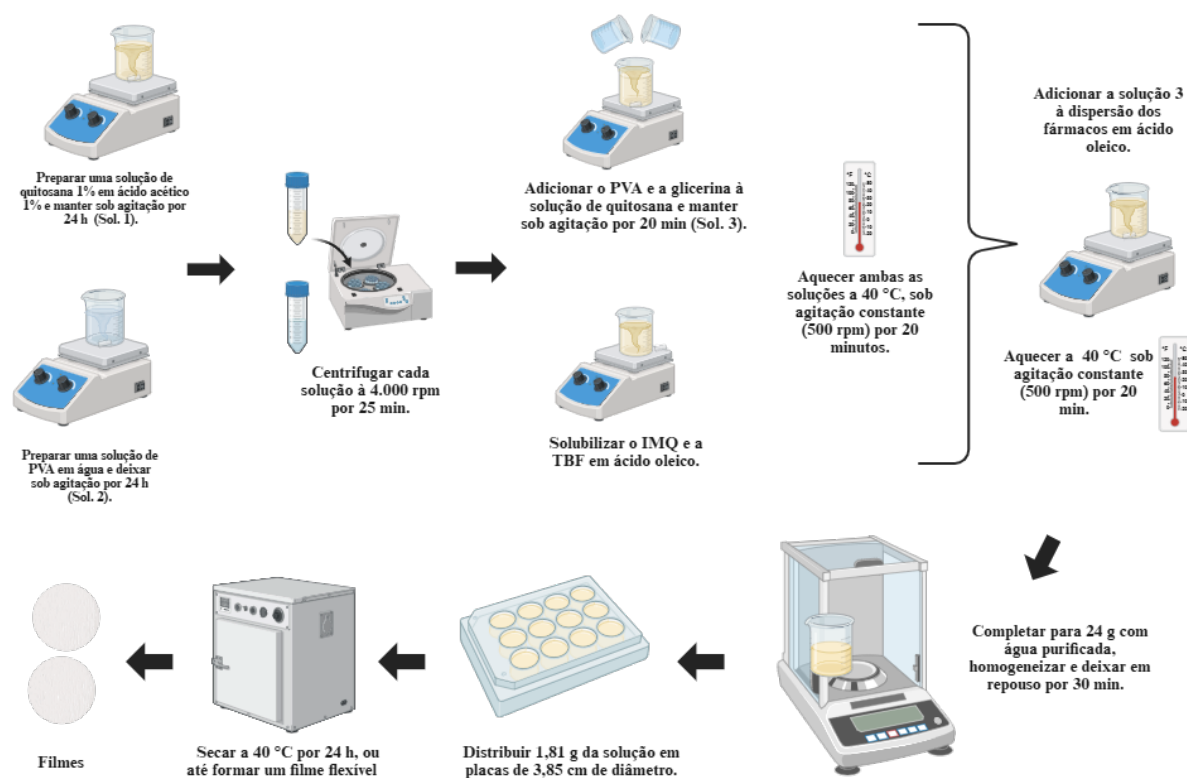


Figura 10. Esquema representativo do preparo dos filmes poliméricos contendo IMQ e TBF. Fonte: Autoria própria.

4.7.1.1 Avaliação dos plastificantes

A partir da base polimérica, foram avaliados diferentes plastificantes: glicerina, PEG[®]400 e sorbitol nas concentrações de 2% e 3% (m/m), conforme apresentado na Tabela 2,

empregando o mesmo procedimento geral. A formulação contendo glicerina a 3% (m/m), denominada F-B4, foi selecionada como matriz base para a etapa subsequente.

Tabela 2. Proporção dos constituintes utilizados na triagem de plastificantes na composição da matriz polimérica dos filmes (Etapa B).

Filme	Quitosana (%)	PVA (%)	PEG 400 (%)	Glicerina (%)	Sorbitol (%)
F-B1	0,5	3	2	-	-
F-B2	0,5	3	3	-	-
F-B3	0,5	3	-	2	-
F-B4	0,5	3	-	3	-
F-B5	0,5	3	-	-	2
F-B6	0,5	3	-	-	3

4.7.1.2 Estratégias de incorporação dos fármacos

Considerando a baixa solubilidade aquosa do IMQ e da TBF, foram avaliadas diferentes estratégias de solubilização visando garantir a incorporação homogênea dos fármacos no filme previamente selecionado. Foram avaliadas diferentes estratégias de incorporação de fármacos, conforme descrito no Quadro 1. As estratégias incluíram incorporação direta, sistemas de cosolvência, solventes aquosos ácidos, sistemas coloidais e lipídicos. Após a secagem, as formulações foram avaliadas macroscopicamente quanto à presença de precipitados, homogeneidade da matriz, continuidade estrutural e integridade mecânica. Dentre as estratégias testadas, as formulações contendo ácido oleico nas concentrações de 1% (F-C17) e 2% (F-C18) (m/m) apresentaram melhor desempenho quanto à incorporação dos fármacos, com ausência de precipitação visível e manutenção da integridade estrutural, sendo selecionadas para as etapas subsequentes de caracterização físico-química.

Quadro 1. Estratégias de incorporação e solubilização dos fármacos na matriz polimérica previamente selecionada (Etapa C). Os filmes foram preparados a partir da formulação base, variando-se a estratégia de incorporação e os agentes de solubilização, com posterior avaliação macroscópica da integridade da matriz e da presença de precipitados após a secagem.

Estratégia de incorporação dos fármacos	Filme	Agente(s) de solubilização	Teor de fármaco (%)	Avaliação macroscópica
Incorporação direta	F-C1	Base do filme	0,25	Presença de precipitado em todas as concentrações
			0,5	
			1,0	
			2,0	
			5,0	
Cosolvência	F-C2	Etanol (30%)	1	Presença de precipitado
	F-C3	Etanol:água pH 2,5 (70:30, v/v) / poloxamer (1%)	0,5	Presença de precipitado
			1,0	
	F-C4	Etanol:tampão acetato de sódio 0,1M pH 4,0 (70:30, v/v)	0,25	Presença de precipitado
			0,5	
			1,0	
	F-C5	Etanol: 1% ácido acético (80:20, v/v)	0,5	Presença de precipitado
			1,0	
	F-C6	Etanol: 2% ácido acético (80:20, v/v)	0,5	Presença de precipitado
			1,0	
	F-C7	Propilenoglicol (3%): poloxamer (1%)	0,5	Presença de precipitado
			1,0	
	F-C8	Propilenoglicol (5%): poloxamer (1%)	0,5	Presença de precipitado
			1,0	
			2,0	
	F-C9	PEG 400 (2%): poloxamer (1%)	1,0	Presença de precipitado
			2,0	
	F-C10	PEG 400 (3%): poloxamer (1%)	1,0	Presença de precipitado
			2,0	
	F-C11	Poloxamer	0,5	Presença de precipitado
			1,0	
Solvente aquoso ácido	F-C12	Solução de ácido acético 1%	0,5	Presença de precipitado
			1,0	
	F-C13	Solução de ácido acético 2%	0,5	Presença de precipitado
			1,0	
Sistema coloidal	F-C14	Nanoemulsão	1,0	Perda de integridade mecânica
Sistema lipofílico	F-C15	Nanopartícula lipídica	0,5	Perda de integridade mecânica
			1,0	
	F-C16	Ácido oleico (33%)	0,5	Perda de integridade mecânica
			1,0	
	F-C17	Ácido oleico (1%)	1,0	Até 2%, ausência de precipitado
			2,0	
			5,0	
	F-C18	Ácido oleico (2%)	1,0	Até 2%, ausência de precipitado

4.7.2 Caracterização dos filmes

Os filmes desenvolvidos foram avaliados quanto às suas características macroscópicas. Posteriormente, procederam-se as determinações de peso, espessura, pH, teor, grau de intumescimento, propriedades mecânicas, bioadesividade e morfologia, conforme as metodologias descritas a seguir.

4.7.2.1 Avaliação das características macroscópicas

A avaliação macroscópica foi realizada por inspeção visual direta, em superfície plana e sob iluminação adequada, com o objetivo de analisar a integridade estrutural e a qualidade superficial dos filmes após a secagem. Foram considerados os seguintes parâmetros: continuidade (ausência de rupturas, fissuras, bolhas ou fraturas após a secagem), homogeneidade (uniformidade visual da matriz polimérica, caracterizada pela ausência de partículas insolúveis, agregados, zonas opacas ou variações de coloração), manuseabilidade (possibilidade de manipulação e desmoldagem sem ruptura) e flexibilidade (capacidade de dobramento sem fratura imediata ou formação de fissuras visíveis). A classificação foi realizada de forma semiquantitativa, conforme uma escala previamente definida: excelente (+++), bom (++) ou insatisfatório (+), de acordo com metodologia descrita na literatura, com adaptações (AMARAL *et al.*, 2024; TOLENTINO *et al.*, 2024).

4.7.2.2 Peso e espessura

Para a determinação do peso, os filmes foram desmoldados e pesados individualmente em uma balança analítica (AUY220, Shimadzu, Kyoto, Japão). Para cada formulação, foram analisadas três unidades ($n = 3$) e os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão (ARAFA *et al.*, 2018). A espessura foi avaliada por meio de medições realizadas em 10 pontos distintos de cada filme, utilizando um paquímetro digital (Mitutoyo, Japão). Os valores também foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (AMARAL *et al.*, 2024; ARAFA *et al.*, 2018).

4.7.2.3 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada com um potenciômetro previamente calibrado (MPA-210, MS-Tecnopon, São Paulo, Brasil). As amostras dos filmes foram dispersas em água purificada, em volume previamente definido, e mantidas sob agitação magnética até a completa desintegração da matriz polimérica (ARAFA *et al.*, 2018). As determinações foram realizadas em triplicata ($n = 3$), e os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão.

4.7.2.4 Determinação do teor de IMQ e TBF

A determinação do teor de IMQ e de TBF nos filmes poliméricos foi realizada por meio da extração dos fármacos da matriz polimérica. Inicialmente, os filmes foram fragmentados em pequenos pedaços e transferidos para um balão volumétrico de 100 mL. Em seguida, foram adicionados 20 mL de solução de ácido acético ajustada ao pH 2,5, mantendo-se o sistema sob agitação magnética (300 rpm) por 12 horas (overnight), com o objetivo de promover a completa solubilização da matriz polimérica. Posteriormente, foram adicionados 50 mL de metanol, e a dispersão foi mantida sob agitação por mais 24 horas. Após esse período, a barra magnética foi removida e o volume foi completado para 100 mL com metanol.

A solução foi centrifugada a 4000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente coletado, filtrado em membrana de 0,45 µm e submetido à análise por CLAE-FL, conforme método previamente validado.

4.7.2.5 Grau de intumescimento

Para esse teste foi utilizado um *sinker* espiral (mola), conforme ilustrado na Figura 11, no qual foi inserido o filme (3,85 cm²). O *sinker* e o filme foram pesados separadamente em balança analítica antes do início do ensaio, a fim de determinar o peso inicial. O *sinker* contendo o filme foi imerso em um béquer com 50 mL de água purificada, mantido à temperatura ambiente. Em intervalos de tempo previamente estabelecidos (1, 2, 3, 4 e 5 minutos), o *sinker* contendo o filme foi retirado com auxílio de pinça, e o excesso de líquido superficial foi removido suavemente com papel absorvente e, posteriormente, repesado. Durante o ensaio, a integridade estrutural dos filmes foi monitorada visualmente, registrando-se a ocorrência de fragmentação ou desprendimento de partículas no meio de imersão. O procedimento foi realizado em triplicata (n = 3) para cada filme (BASKAR; SAMPATH KUMAR, 2009). O ensaio foi repetido nas mesmas condições, utilizando tampão acetato de sódio 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0) como meio de imersão. O percentual de intumescimento (li%) foi calculado de acordo com a Equação (5).

$$li\% = \frac{(Peso\ final - Peso\ inicial)}{(Peso\ inicial)} \times 100 \quad (5)$$

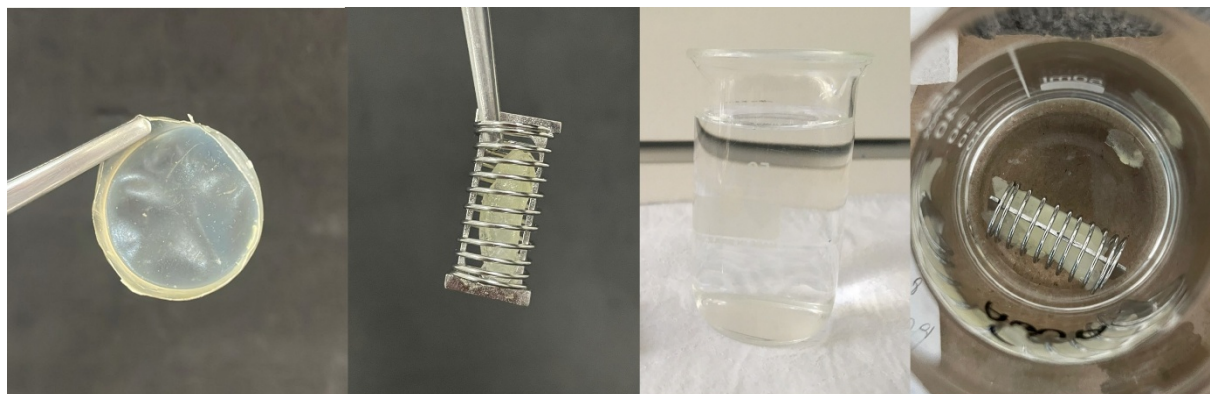


Figura 11. Representação do ensaio de intumescimento dos filmes. Fonte: Autoria própria.

4.7.2.6 Propriedades mecânicas

As análises foram realizadas utilizando um texturômetro (TA-XT Plus, Stable Micro Systems, Reino Unido), equipado com célula de carga de 5 kg e garras do tipo cunha (Tensile Grips, Ref: TRT1/TG). As garras movem-se horizontalmente para a fixação da amostra antes do ensaio e verticalmente para a aplicação da força de tração, como representado na Figura 12.

Os filmes, com área de $3,85 \text{ cm}^2$, foram fixados adequadamente em cada uma das extremidades do aparato, utilizando-se 5 mm de filme em cada garra, resultando em uma distância inicial entre garras (l_0) de aproximadamente 12 mm. Durante o ensaio, uma das garras permaneceu fixa à base do equipamento, enquanto a outra foi acoplada ao braço móvel responsável pela aplicação da força. A velocidade de tração foi definida em $2 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$, com força inicial de 0,049 N. As amostras foram submetidas à tração até a ruptura ou ao limite máximo de deformação do equipamento (VECCHI *et al.*, 2021).

Os parâmetros analisados foram a força máxima (N) e o alongamento máximo (%), obtidos diretamente do software do equipamento (Tensile strength/Extensibility/Elongation – Tensile Grips, Ref: TRT1/TG). O ensaio foi realizado em triplicata ($n = 3$), e os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão da força necessária para romper cada filme.

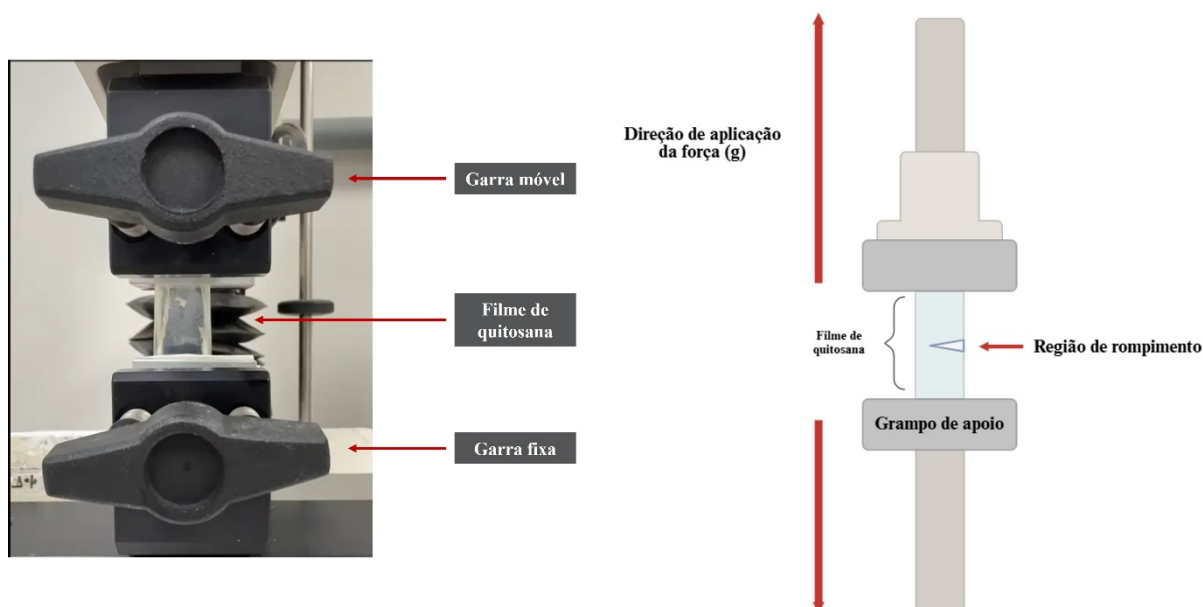


Figura 12. Esquema representativo do teste de propriedade mecânica realizado em texturômetro (Stable Micro Systems TA-XT Plus) com os filmes de quitosana. Fonte: Autoria própria.

4.7.2.7 Avaliação da bioadesividade

A bioadesividade dos filmes foi avaliada por meio do ensaio de força de destacamento, utilizando discos de mucina como modelo (EOUANI *et al.*, 2001; THIRAWONG *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2023). Embora os filmes não sejam destinados à aplicação em mucosas, a mucina foi empregada como substrato biológico simplificado para investigar a capacidade de adesão do sistema polimérico em condições de superfície hidratada, visando simular parcialmente o microambiente presente em lesões cutâneas de CBM. Para o ensaio, foram preparados discos de mucina de 9 mm de diâmetro, obtidos a partir de 250 mg de mucina, moldados com a adição de 75 μ L de uma solução de mucina a 8% (m/v) em água destilada. As análises foram realizadas em um analisador de textura (TA-XT2, Stable Micro Systems, Reino Unido), operando no modo de compressão.

Os discos de mucina foram fixados à extremidade de uma sonda cilíndrica de 10 mm de diâmetro e, posteriormente, hidratados por imersão em solução de mucina a 8% (m/v) por 30 s. Após a hidratação, o excesso de líquido superficial foi cuidadosamente removido (COSTA *et al.*, 2023). Os filmes foram previamente umectados com água destilada por 60 s, antes do ensaio e, em seguida, fixados a um suporte de acrílico posicionado na base do equipamento. A sonda contendo o disco de mucina foi deslocada verticalmente até entrar em contato com a superfície do filme, aplicando-se força de compressão de 0,2 N durante 60 s (Figura 13).

Após o período de contato, a sonda foi retirada a uma velocidade constante de 0,5 $\text{mm} \cdot \text{s}^{-1}$, e a força máxima necessária para a separação do disco de mucina do filme foi registrada

automaticamente pelo software *Texture Exponent Lite* (EOUANI *et al.*, 2001; THIRAWONG *et al.*, 2007). O ensaio foi realizado em triplicata para cada formulação, e os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, sendo a força máxima de destacamento (N) considerada o parâmetro representativo da bioadesividade dos filmes.

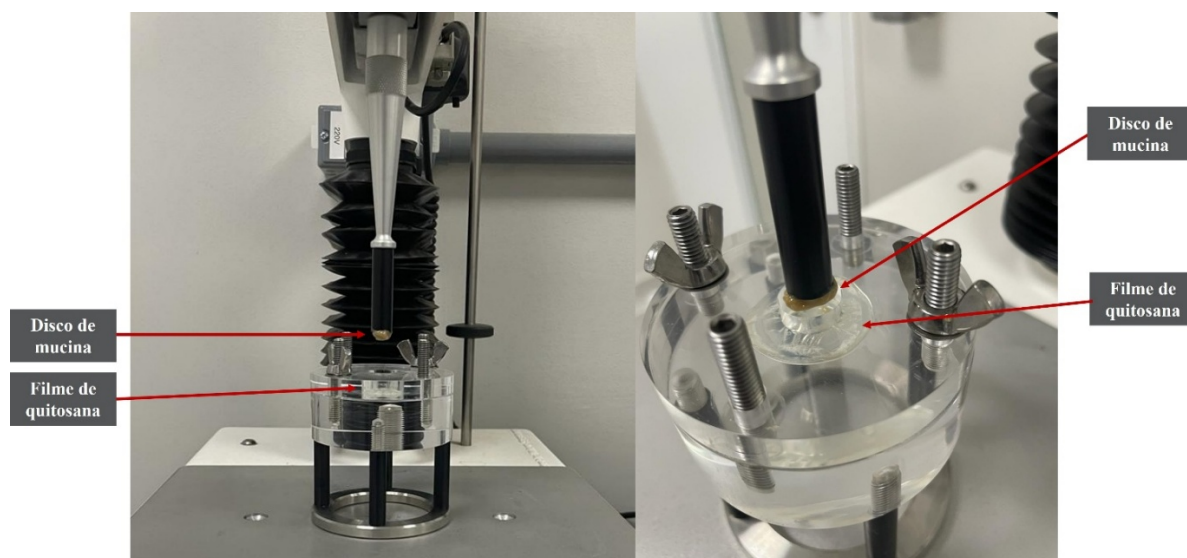


Figura 13. Representação do ensaio de bioadesividade. Módulo do texturômetro TA-XT2 (Stable Micro Systems), no momento de deslocamento do disco de mucina e no contato entre o disco de mucina e o filme. Fonte: Autoria própria.

4.7.2.8 Morfologia

A morfologia superficial dos filmes foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizando microscópio JSM-7000F (JEOL, Japão). Para a análise, cada filme contendo os fármacos ou não (branco) foi previamente fixado em suportes metálicos (*stubs*) com fita condutora de carbono, posicionados nas orientações superficiais e transversais. Em seguida, as amostras foram metalizadas com ouro e analisadas em diferentes aumentos.

4.8 ESTUDO DE ESTABILIDADE

O estudo de estabilidade dos filmes foi conduzido com amostras em triplicata ($n = 3$) para cada formulação, acondicionadas em sachês de alumínio e armazenadas sob duas condições: à temperatura ambiente (25 °C) e sob refrigeração (4 °C). O estudo teve como finalidade avaliar o peso, a espessura e as características macroscópicas dos filmes contendo IMQ e TBF. As avaliações foram realizadas nos tempos previamente estabelecidos: 0, 7 e 14 e 30 dias. Ao final de cada período, as amostras eram retiradas da embalagem, fotografadas e analisadas conforme os procedimentos específicos descritos para cada parâmetro.

4.9 ESTUDOS *IN VITRO* DE LIBERAÇÃO DE IMQ E TBF A PARTIR DOS FILMES

O perfil de liberação *in vitro* do IMQ e TBF a partir dos filmes desenvolvidos foi avaliado utilizando o sistema de difusão vertical Phoenix™ DB-6 (Teledyne Hanson). Esse equipamento acopla células de difusão vertical do tipo Franz (Figura 14) a módulos de aquecimento e agitação controlados (Figura 15).

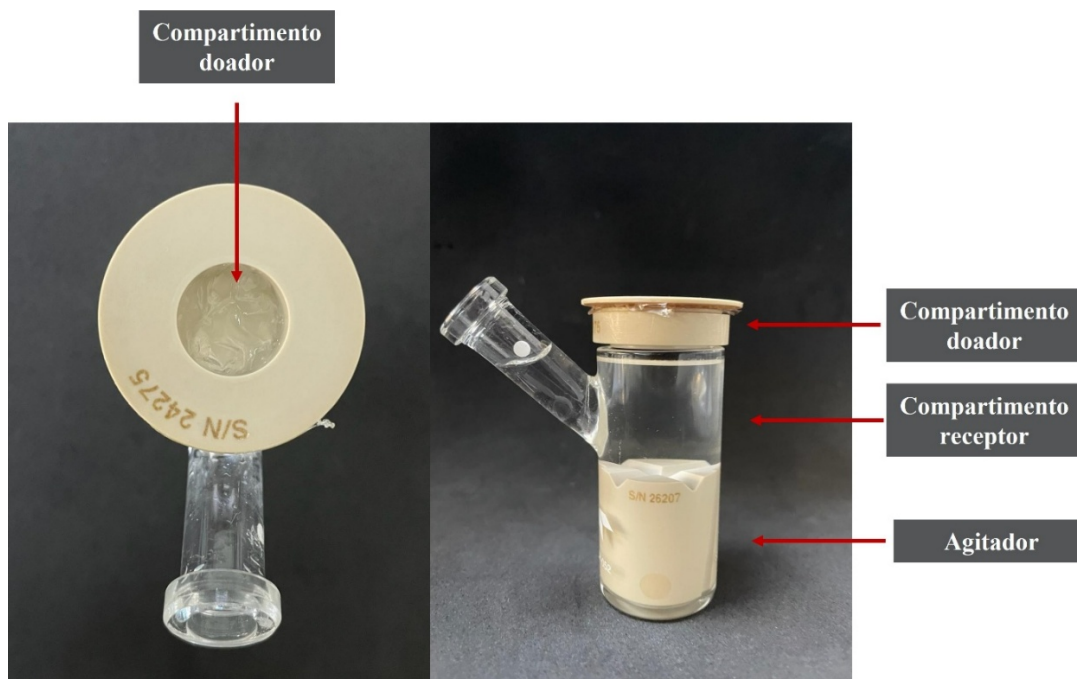


Figura 14. Célula de difusão e seus componentes. Fonte: Autoria própria.

O ensaio foi conduzido empregando membrana sintética de celulose (*dialysis tubing cellulose membrane*, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) posicionada entre o compartimento doador e receptor da célula de Franz. O compartimento receptor foi preenchido com 15 mL de tampão acetato de sódio pH 4,0, previamente equilibrado a 37 °C, de modo a garantir a manutenção das condições sink. Os filmes F-C17 e F-C18 foram posicionados no compartimento doador, em contato direto com a membrana, que permanecia voltada para o meio receptor. Adicionalmente, como controle, foram avaliadas suspensões aquosas contendo fármacos livres, submetidas às mesmas condições experimentais. Durante todo o experimento, a temperatura foi mantida a 37 °C, com agitação do meio receptor a 300 rpm, por um período total de 12 horas.



Figura 15. Sistema de difusão vertical Phoenix DB-6 (Teledyne Hanson). Fonte: Adaptado de Tolentino, 2024.

Amostras da solução receptora foram coletadas nos tempos 0,5; 1,0; 1,5; 2; 2,5; 3,0; 3,5; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11 e 12 h. A cada coleta, uma alíquota de 1 mL era retirada do meio receptor e igual volume do tampão acetato de sódio com pH 4,0 foi imediatamente repostado. As amostras coletadas foram filtradas em membrana com porosidade de 0,45 μm e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência, com detecção por fluorescência, conforme o método analítico previamente validado. O experimento foi realizado em quintuplicata para cada formulação.

O perfil de liberação foi expresso como porcentagem cumulativa de fármaco liberado em função do tempo (h), considerando-se a quantidade total inicialmente presente no sistema.

Os dados experimentais de liberação foram ajustados a diferentes modelos cinéticos para elucidar o mecanismo predominante de liberação. Foram avaliados os modelos matemáticos de ordem zero (porcentagem cumulativa do fármaco liberado *versus* tempo), modelo de primeira ordem (log da porcentagem acumulada do fármaco restante *versus* tempo) modelo de Higuchi (porcentagem acumulada da liberação do fármaco *versus* raiz quadrada do tempo), Hixson Crowell (está relacionado com a massa da molécula do fármaco inicialmente e no tempo t além da área superficial e o volume da molécula do fármaco) e Weibull (log da porcentagem liberada acumulada *versus* log do tempo). A escolha do modelo cinético que melhor descreveu a liberação de cada fármaco baseou-se na análise do coeficiente de correlação linear (R^2), sendo considerado o mais apropriado aquele que apresentou o valor mais próximo de 1.

4.10 ENSAIOS *IN VITRO* DE PENETRAÇÃO CUTÂNEA

Os experimentos foram conduzidos em células de difusão do tipo Franz com área de difusão de 1,6 cm², acopladas ao sistema Phoenix® DB-6 (Teledyne Hanson Inc., Chatsworth, CA, USA). As células foram montadas com pele suína posicionada entre os compartimentos doador e receptor. No compartimento doador, foram inseridas amostras dos filmes F-C17 e F-C18 pesos previamente embebidas com 200 µL de água purificada. O compartimento receptor foi preenchido com 15 mL de tampão acetato de sódio pH 4,0. Para o controle, o compartimento doador foi preenchido com 1 mL de uma suspensão aquosa contendo os fármacos livres nas mesmas concentrações empregadas nos filmes (2% de IMQ e de TBF). O sistema foi mantido sob agitação magnética (300 rpm) a 37 °C e conduzido em quintuplicata para cada amostra.

Ao final do experimento, foi coletada uma alíquota de 1 mL da solução receptora para a determinação do conteúdo de IMQ e de TBF. Após a desmontagem das células, cada fragmento de pele foi cuidadosamente removido, mantido na posição vertical e submetido à lavagem com água destilada por 5 segundos, a fim de remover resíduos superficiais da formulação. Em seguida, o excesso de líquido foi retirado com papel absorvente, sem exercer pressão excessiva.

As amostras de pele foram colocadas horizontalmente sobre uma superfície plana, com o EC voltado para cima. Em seguida, o EC foi removido por meio da aplicação sucessiva de 15 fitas adesivas. As fitas contendo o EC foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar. A PR foi posteriormente fragmentada em pequenos pedaços e acondicionada separadamente em frascos de vidro âmbar.

O processo de extração dos fármacos presentes tanto no EC quanto na PR foi conduzido por 12 horas, sob agitação, à temperatura ambiente. Após esse período, as amostras foram filtradas por membrana de 0,45 µm e analisadas por CLAE-FL para a quantificação dos fármacos. Os resultados foram apresentados como a quantidade de IMQ e TBF que penetrou em cada camada da pele, por cm² de área analisada.

4.11 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IRRITATIVO DOS FILMES

4.11.1 Ensaio *in vitro* em membrana cório-alantoide de ovos de galinha embrionados (HET-CAM)

O ensaio em membrana cório-alantoide de ovos embrionados de galinha HET-CAM (*Hens Egg Test - Chorion Allantoic Membrane*), foi empregado para avaliação do potencial irritativo dos filmes desenvolvidos. Foram utilizados ovos embrionados com 10 dias de

incubação, mantidos a $37,8 \pm 1$ °C, fornecidos pela Avifran (Planaltina, Brasil) e utilizados no mesmo dia da coleta (LUEPKE, 1985).

Inicialmente, os ovos foram posicionados com a câmara de ar voltada para cima. A casca foi cuidadosamente removida na região correspondente à câmara de ar, expondo-se a membrana externa. Em seguida, a membrana da casca foi removida com auxílio de uma pinça, permitindo a exposição da membrana cório-alantoide. Então, sobre essa membrana foram aplicados 300 µL de cada uma das seguintes soluções:

- Solução salina 0,9% (p/v), utilizada como controle negativo;
- Solução de hidróxido de sódio (NaOH) $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, utilizada como controle positivo;
- Formulação polimérica líquida contendo IMQ e TBF, destinada à formação do filme.
- Filmes secos contendo IMQ e TBF (F-C17 e F-C18), previamente umedecidos para permitir contato uniforme com a membrana.

As membranas cório-alantoides foram expostas às respectivas soluções por 20 segundos e, em seguida, lavadas com solução salina 0,9% e examinadas por 5 minutos (Figura 16).

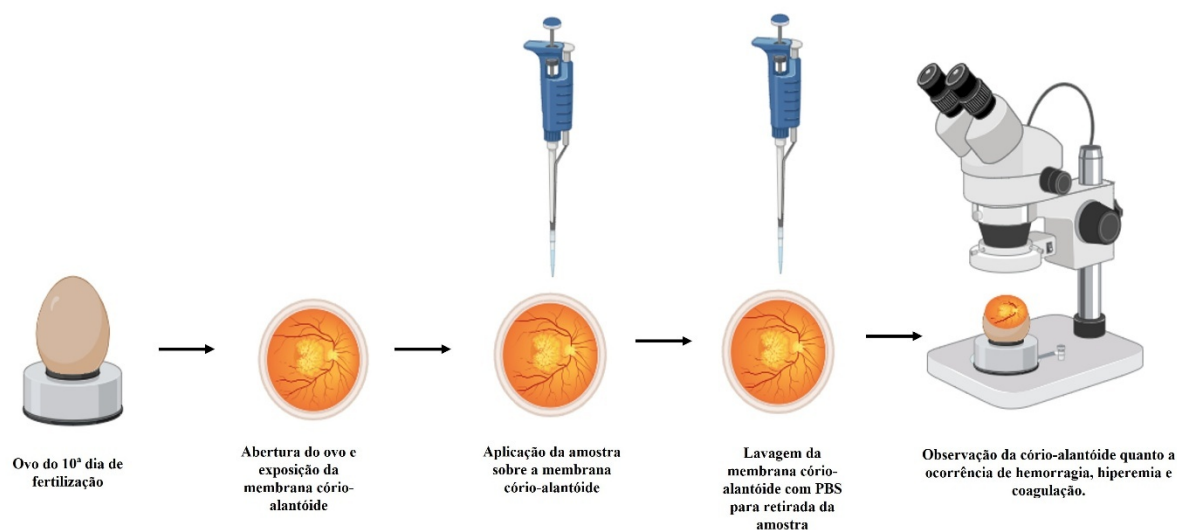


Figura 16. Representação esquemática do ensaio HET-CAM. Fonte: Adaptado de Tolentino, 2024.

Durante esse período, foram monitorados os seguintes parâmetros: hiperemia, hemorragia e coagulação intravascular (trombose) aos tempos de 30, 120 e 300 segundos após a aplicação. A observação foi realizada por meio de um microscópio acoplado a uma lupa. O índice de irritação (II) foi calculado conforme a Equação (6).

$$II = \frac{(301 - HE) \times 5}{300} + \frac{(301 - HP) \times 7}{300} + \frac{(301 - CO) \times 9}{300} \quad (6)$$

Em que II = índice de irritabilidade; HE = tempo para a ocorrência de hemorragia (segundos); HP = tempo para a ocorrência de hiperemia (segundos); e CO = tempo para a ocorrência de coagulação/opacidade (segundos).

A classificação final dos filmes quanto ao potencial irritante foi realizada conforme os critérios descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Classificação do potencial irritante segundo o índice de irritabilidade.

Índice de irritabilidade	Classificação
0 – 0,9	Não irritante (NI)
1 – 4,9	Irritante Leve (IL)
5 – 8,9	Irritante Moderado (IM)
9 – 21,0	Irritante Severo (IS)

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A construção dos cromatogramas foi realizada com o uso do programa *Origin 8*. As análises estatísticas foram realizadas utilizando software *GraphPad Prism 8.0*, adotando-se níveis de significância de $p < 0,05$. As diferenças entre os conjuntos de dados foram avaliadas por meio de testes de análise de variância unidirecional (*one-way* ANOVA) ou bidirecional (*two-way* ANOVA), seguidos da aplicação dos testes de comparações múltiplas de *Tukey* ou de *Sidak*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

5.1.1 Desenvolvimento do método analítico

Para o desenvolvimento e a avaliação de desempenho de novas formulações, é necessário utilizar um método analítico adequado para identificar e quantificar os fármacos (IMQ e TBF) de forma seletiva. Esse método deve ser capaz de separar os fármacos dos possíveis interferentes presentes na formulação, na matriz biológica e no meio receptor utilizado nos estudos de penetração cutânea.

Na literatura, existem métodos descritos para a quantificação do IMQ em matrizes biológicas utilizando CLAE, com detecção por UV e por fluorescência (DONNELLY *et al.*, 2006; LAPTEVA *et al.*, 2019). A detecção por fluorescência apresenta maior sensibilidade quando comparada ao UV, sendo uma alternativa vantajosa principalmente para amostras com baixas concentrações.

Para a TBF, a maioria dos métodos descritos utiliza detecção por UV (SACHDEVA *et al.*, 2010; THATAI; SAPRA, 2018), havendo poucos relatos sobre o uso de CLAE com detecção por fluorescência em fase reversa (BELAL *et al.*, 2017). Além disso, não são encontrados trabalhos que descrevam a quantificação simultânea de IMQ e TBF em associação, na mesma formulação, utilizando detecção por fluorescência.

O desenvolvimento do método analítico para a quantificação simultânea dos fármacos começou com a realização de testes em CLAE, com detecção por UV. O comprimento de onda na qual o IMQ apresentou absorção máxima da luz UV ocorreu em 244 nm, já para TBF absorção foi de 274 nm, e, portanto, esses foram o comprimento de onda selecionados para a detecção dos fármacos. No entanto, os resultados mostram-se insatisfatórios, uma vez que os picos cromatográficos não atendiam simultaneamente a critérios adequados de resolução, simetria e retenção, comprometendo a seletividade do método.

Somado a isso, observa-se diferença significativa na intensidade dos sinais, sendo os picos de TBF menos intensos que os de IMQ nas mesmas condições, dificultando o ajuste simultâneo das concentrações. Durante os testes preliminares, observou-se que as concentrações inicialmente avaliadas de IMQ possivelmente promoviam a saturação da coluna, sugerindo sobrecarga da fase estacionária e contribuindo para a deformação dos picos e para a perda de reprodutibilidade.

Na tentativa de solucionar os problemas identificados na análise por CLAE-UV, opta-

se pela detecção por fluorescência. Essa técnica permite a utilização de concentrações mais baixas de fármacos, apresenta maior sensibilidade, além de reduzir interferências provenientes da matriz. Assim, a CLAE-FL mostra-se mais adequada para a quantificação simultânea de IMQ e TBF, garantindo melhor desempenho analítico e maior confiabilidade aos estudos de teor, liberação e penetração cutânea. Os comprimentos de onda de excitação (236 nm) e emissão (340 nm) foram definidos com base em dados da literatura e posteriormente avaliados nas condições cromatográficas do presente estudo, tanto para os fármacos isolados quanto em associação.

Durante o desenvolvimento do método analítico, foram testadas diferentes composições de fase móvel (metanol, acetonitrila e água), contendo ou não aditivos (ácido fosfórico, ácido acético, trietilamina, ácido fórmico), em várias proporções e modos de eluição (isocrático ou por gradiente de concentração). Foram realizados inúmeros ensaios com o objetivo de estabelecer condições cromatográficas adequadas para a quantificação dos fármacos, garantindo que os contaminantes da pele e da formulação não interferissem nas análises. Os testes foram conduzidos de forma empírica até a obtenção de condições que permitissem separação eficiente dos dois analitos, com picos bem definidos e livres de sobreposição. Alguns dos principais ajustes realizados nas condições cromatográficas para obtenção de picos com adequada resolução e ausência de interferentes encontram-se descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Condições cromatográficas testadas no desenvolvimento do método CLAE com detecção UV e fluorescência para quantificação simultânea de IMQ e TBF. IMQ – imiquimode; TBF – cloridrato de terbinafina.

Coluna	Fase Móvel (v/v)	Tempo de retenção (minutos)		Fator de simetria (cauda)		Pratos Teóricos		Características do pico	
		IMQ	TBF	IMQ	TBF	IMQ	TBF	IMQ	TBF
Método isocrático									
Coluna Discovery C18 (250 x 4,6, 5µm)	Metanol: água (85:15)	3,4	3,7	3,48	0,84	2.411	-	Picos sobrepostos	Picos sobrepostos
Coluna Discovery C18 (250 x 4,6, 5µm)	Metanol: acetonitrila: água pH 4,0 (ácido acético) (55:40:5)	3,6	4,1	1,68	-	1397	632	Picos sobrepostos	Picos sobrepostos
Coluna Discovery C18 (150 x 4,6, 5µm)	Metanol: acetonitrila: água pH 4,5 (ácido fosfórico) (80:10:10)	1,2	2,9	1,56	1,31	1.661	870	Pico adiantado	Pico adiantado
Coluna Discovery C18 (150 x 4,6, 5µm)	Metanol: água pH 4,0 (ácido fosfórico) (60:10:30)	1,2	3,4	1,67	-	2.247	1.229	Pico adiantado	Pico adiantado

Coluna Discovery C18 (150 x 4,6, 5µm)	Acetonitrila: água pH 3,0 (ácido acético (5:95))	3,3	6,1	1,45	-	2.561	1.561	Pico adequado	Pico largo
Coluna Luna C18 (150 x 4,6, 3µm)	Metanol: acetonitrila: água pH 3,0 (ácido acético) (55:40:5)	6,15	-	0,80	-	747	-	Pico largo	-
Coluna Discovery C18 (250 x 4,6, 5µm) Pré- coluna (5µm)	Metanol: água pH 3,0 (ácido fosfórico) (80:20)	2,6	-	3,04	-	-	-	Pico adiantado	-
Método gradiente									
Coluna Discovery C18 (250 x 4,6, 5µm)	0-5 Acetonitrila: água pH 3,0 (5:95) 5-15 Acetonitrila:metanol:água pH 3,0 (35:10:55) 20 Acetonitrila:água pH 3,0 (5:95)	10,2	12,7	0,7	0,6	2.245	1.537	Pico adequado	Pico adequado
Coluna Discovery C18 (250 x 4,6, 5µm) Pré- coluna (5µm)	0-5 Acetonitrila:água (5:95) 5 - 15 Acetonitrila:metanol:água (35:20:45) 16-26 Acetonitrila: metanol: água (25:70:5) 26-31 Acetonitrila:água (5:95)	11,2	24,7	1,6	0,7	2.670	1.248	Pico adequado	Pico adequado
CLAE UV e Fluorescência									
Coluna Discovery C18 (250 x 4,6, 5µm) Pré- coluna (5µm)	Metanol: água pH 3,0 (ácido acético) (55:45)	2,58	5,45	1,8	1,2	-	2.329	Pico adiantado	Pico adequado
Coluna C8 Lichrospher RP Select B-5 125 x 4,0 mm (supelco)	Metanol (ácido fórmico 0,1%):água (ácido fórmico 0,1%)	3,6	11,5	1,2	1,0	4.824	2.573	Pico adequado	Pico adequado

Inicialmente, foram avaliadas condições em modo isocrático utilizando colunas C18 com diferentes proporções de metanol, acetonitrila e água. Nas primeiras tentativas, observou-se sobreposição dos picos de IMQ e TBF, além de fatores de simetria inadequados, indicando baixa resolução cromatográfica. Em algumas condições, o IMQ apresentou eluição precoce, sugerindo retenção insuficiente na fase estacionária, possivelmente relacionada ao seu grau de ionização nas condições avaliadas.

Verificou-se que a utilização de fases móveis em pH ácido proporcionou melhor definição dos picos e melhora na simetria e na reprodutibilidade, uma vez que IMQ e TBF são bases fracas e, em meio ácido, permanecem predominantemente protonadas, reduzindo interações secundárias com grupos silanol residuais da fase estacionária (SACHDEVA *et al.*, 2010; TELÓ *et al.*, 2017). No entanto, mesmo com ajustes na composição orgânica e no pH, não foi possível obter, simultaneamente, boa resolução e eficiência cromatográfica para ambos os analitos em todas as condições testadas.

A utilização do modo gradiente promoveu uma melhora significativa na separação, com picos mais bem definidos, melhores fatores de simetria e um aumento no número de pratos teóricos. Entretanto, observou-se que as concentrações inicialmente avaliadas de IMQ possivelmente promoviam sobrecarga da coluna, caracterizada por deformação e alargamento do pico, o que comprometeu a reprodutibilidade das análises.

Por fim, foi avaliada a coluna C8 *Lichrospher* RP Select B-5, associada ao ajuste da fase móvel composta por metanol e água contendo ácido fórmico a 0,1%. A redução da hidrofobicidade da fase estacionária favoreceu um melhor equilíbrio entre retenção e eficiência para ambos os fármacos, especialmente para a TBF. Nessa condição, observaram-se picos bem resolvidos, com fatores de simetria próximos de 1,0 e maior eficiência cromatográfica, indicando adequada seletividade e reprodutibilidade. Dessa forma, essa condição foi considerada a mais apropriada para a quantificação simultânea dos fármacos.

Considerando a necessidade de maior sensibilidade e de minimizar as interferências da matriz, a detecção por fluorescência foi escolhida para a validação do método analítico de IMQ e TBF, devido à sua maior seletividade e desempenho em comparação à detecção por UV. A fluorescência permite a quantificação de concentrações mais baixas dos analitos e apresenta menor ruído. Além disso, utiliza comprimentos de onda distintos para a excitação e a emissão, o que aumenta sua especificidade e reduz interferências de outros compostos (DONNELLY *et al.*, 2006). Dessa forma, a fluorescência se mostrou a melhor opção para a quantificação simultânea dos fármacos, assegurando maior precisão e confiabilidade dos resultados.

5.1.2 Seletividade

A seletividade de um método analítico é a capacidade de identificar e quantificar os fármacos, mesmo na presença de possíveis interferentes presentes na amostra (ANVISA, 2017).

A seletividade do método analítico foi determinada por meio da comparação dos cromatogramas de uma solução contendo IMQ e TBF, eluídos na presença e na ausência dos contaminantes, em cada camada da pele (EC e PR), dos componentes do filme e do meio

receptor. A sobreposição dos cromatogramas dos interferentes em relação aos fármacos está representada na Figura 17.

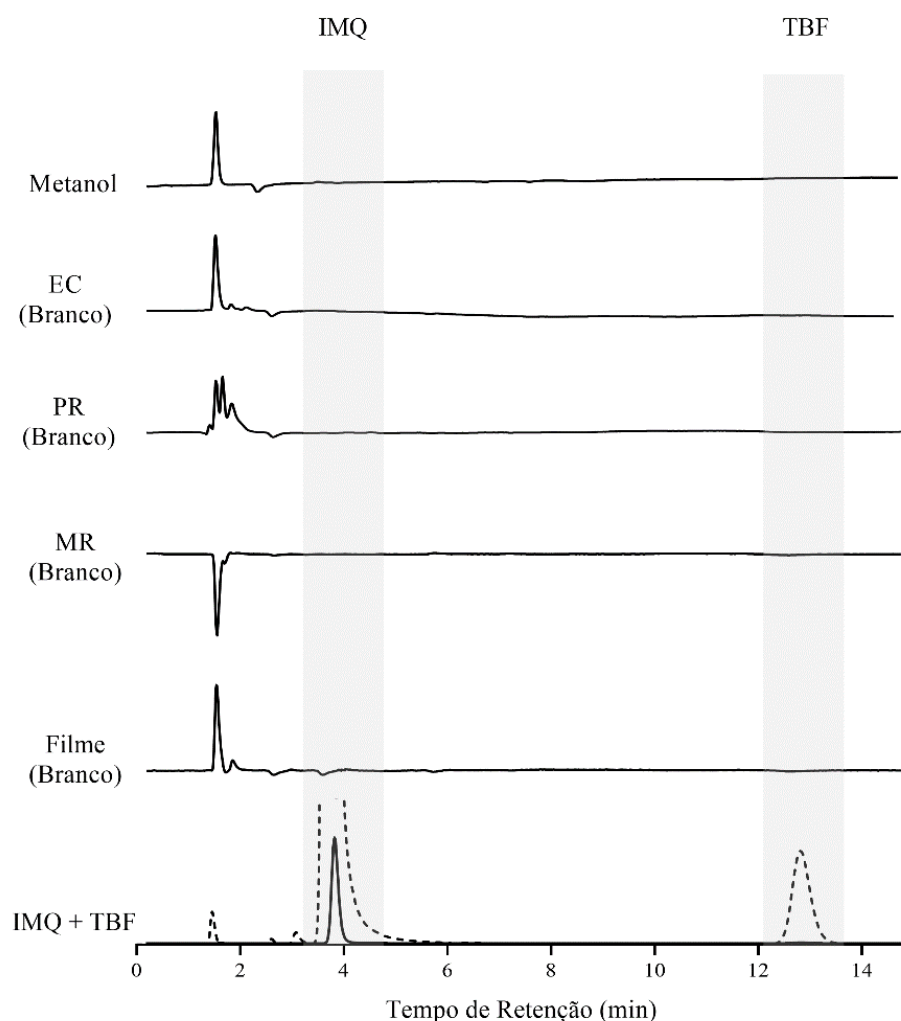


Figura 17. Cromatogramas representativos de IMQ e de TBF, comparados aos interferentes isolados do EC, PR, MR e filme sem fármacos, obtidos seguindo o método estabelecido CLAE-FL. IMQ – imiquimode; TBF – cloridrato de terbinafina; EC – estrato córneo; PR – pele remanescente e MR – meio receptor. Fonte: Autoria própria.

Nas condições cromatográficas estabelecidas, os possíveis interferentes não apresentaram resposta detectável no tempo de retenção dos fármacos, o que indica confiabilidade tanto do IMQ quanto da TBF em amostras contendo os contaminantes. A área do pico cromatográfico de cada fármaco em metanol foi avaliada em relação às áreas obtidas na presença dos diferentes interferentes (Figura 18), a fim de identificar se os interferentes alterariam os picos de cada fármaco. Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as amostras analisadas na ausência e na presença de cada interferente, tanto em relação às áreas dos picos quanto aos tempos de retenção, para ambos os fármacos.

Esses resultados confirmam que o método apresenta adequada seletividade, permitindo a quantificação confiável do IMQ e da TBF mesmo na presença de componentes provenientes da matriz da pele, meio receptor e do filme.

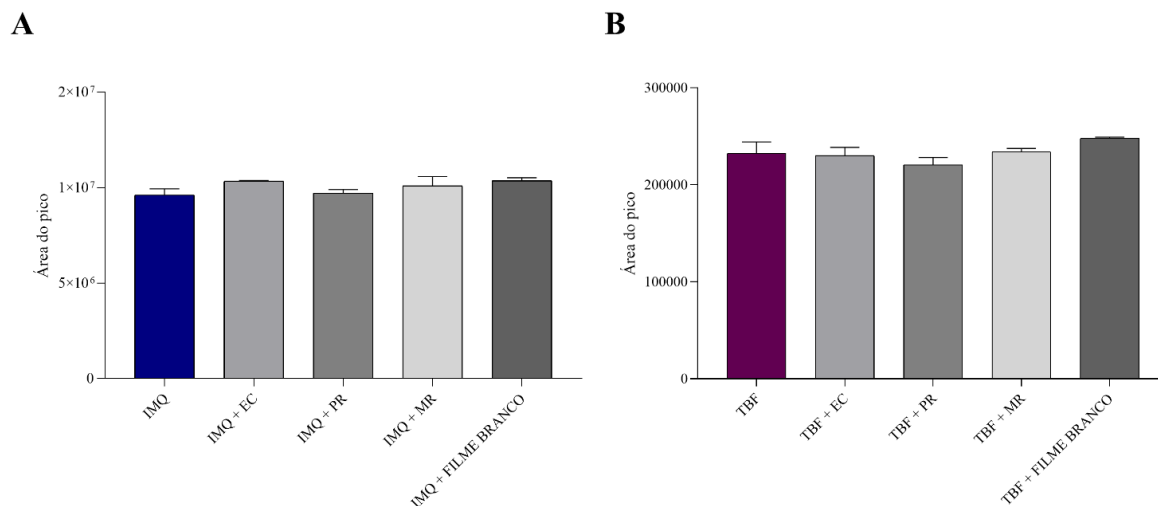


Figura 18. Avaliação da seletividade dos métodos de quantificação para (A) IMQ e (B) TBF, em metanol e na presença de possíveis interferentes, expressa como diferença entre as áreas dos picos. Análise estatística realizada por ANOVA ($p \leq 0,001$). IMQ – imiquimode; TBF – cloridrato de terbinafina; EC – estrato córneo; PR – pele remanescente; MR – meio receptor. Fonte: Autoria própria.

5.1.3 Linearidade

A linearidade representa a capacidade do método de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra (ANVISA, 2017). As curvas analíticas para a quantificação de TBF e IMQ estão representadas na Figura 19.

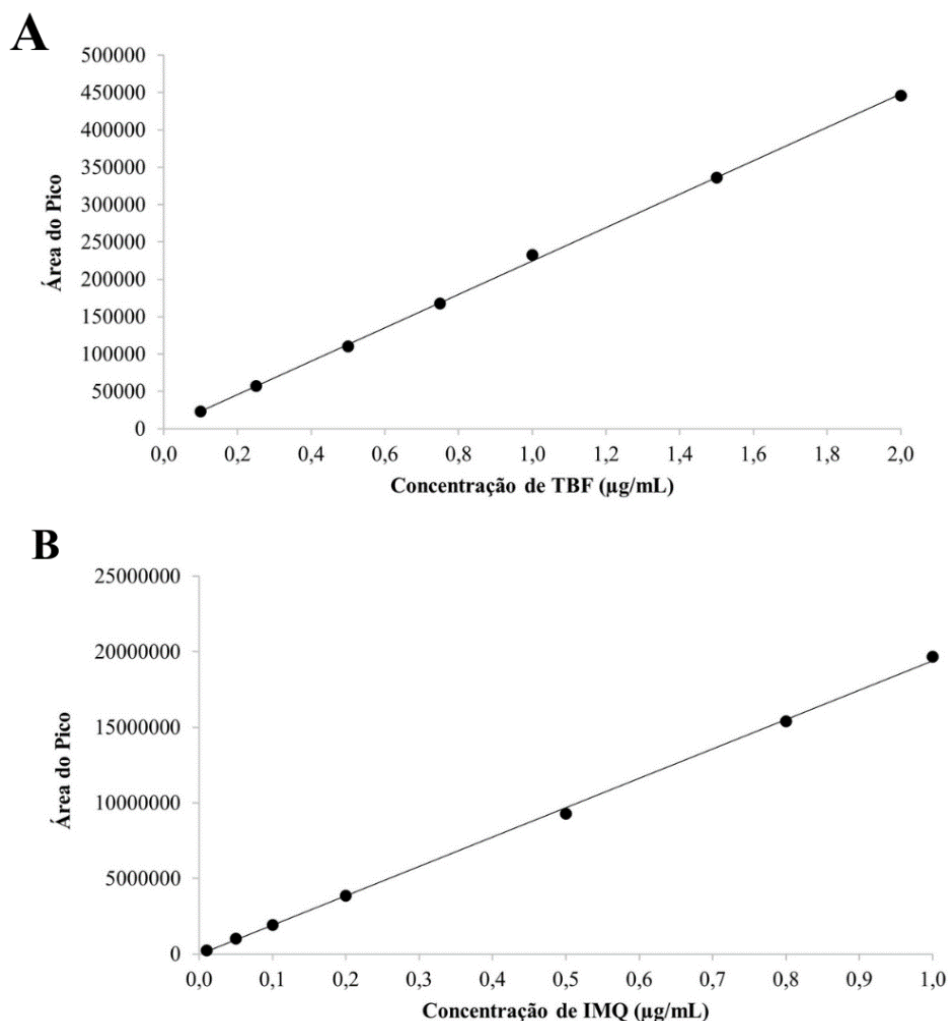


Figura 19. Representação gráfica das curvas analíticas. (A) TBF na faixa de concentração de 0,1 a 2,0 µg/mL; equação da reta: $y = 223373x + 1467,8$; $r^2=0,9995$ e (B) IMQ na faixa de concentração de 0,01 a 1,0 µg/mL; equação da reta: $y = 20000000x - 47158$; $r^2=0,9992$. IMQ – imiquimode; TBF – cloridrato de terbinafina. Fonte: Autoria própria.

A relação entre a área do pico dos fármacos de cada amostra e a respectiva concentração, na faixa de 0,01 µg/mL a 1,0 µg/mL para o IMQ e de 0,1 µg/mL a 2,0 µg/mL para a TBF, foi linear. A equação de regressão linear para o IMQ é $y = 20000000x - 47158$. A equação obtida para a TBF foi $y = 223373x + 1467,8$, em que y representa a área do pico e x, a concentração dos fármacos em µg/mL. O coeficiente de correlação linear foi de 0,9992 para o IMQ e de 0,9995 para a TBF. Ambos os resultados estão de acordo com as diretrizes padronizadas tanto pela ANVISA (2017) quanto pelo ICH (2023).

A área do pico e os valores de concentração foram proporcionais em uma ampla faixa de concentrações. O coeficiente angular foi diferente de zero. Os valores dos coeficientes de correlação linear também atendem aos requisitos vigentes para validação, que devem ser acima de 0,99.

5.1.4 Limites e detecção e quantificação

O limite de detecção refere-se à menor concentração do analito na amostra que pode ser detectada; porém, o valor não necessariamente pode ser quantificado com exatidão. Já o limite de quantificação refere-se à menor concentração do analito presente em uma amostra que pode ser analisada com precisão e exatidão aceitáveis, considerando as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2017). A Tabela 5 apresenta os limites de detecção e de quantificação, respectivamente, calculados para ambos os valores de interesse.

Tabela 5. Valores teóricos dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do IMQ e do TBF. IMQ – imiquimode; TBF – cloridrato de terbinafina.

Fármaco	LD (µg/mL)	LQ (µg/mL)
IMQ	0,01	0,02
TBF	0,05	0,16

Para o IMQ, o limite de detecção foi de 0,01 µg/mL, correspondente à menor concentração da curva de calibração. O limite de quantificação foi de 0,02 µg/mL, valor inferior à segunda menor concentração da curva analítica. Para a TBF, o limite de detecção foi de 0,05 µg/mL, valor inferior ao ponto mínimo da curva analítica, enquanto o limite de quantificação foi de 0,16 µg/mL, equivalente à menor concentração da curva de calibração.

Os baixos valores de limite de detecção e de quantificação para ambos os fármacos demonstram a elevada sensibilidade do método analítico, evidenciando sua capacidade de quantificar pequenas quantidades de fármacos retidas no ECe na PR, aspecto fundamental para estudos de permeação cutânea.

Considerando a aplicação do filme bioadesivo desenvolvido, contendo 2% de IMQ e 2% de TBF (3000 µg de cada fármaco), o método é capaz de quantificar aproximadamente 0,00033% da dose de IMQ e 0,00167% da dose de TBF que venham a penetrar ou permanecer retidas nas camadas da pele, reforçando sua elevada sensibilidade para estudos de permeação cutânea.

Dessa forma, o método desenvolvido mostra-se adequado ao objetivo proposto, permitindo determinar pequenas quantidades de fármacos nas diferentes camadas da pele após os ensaios de permeação, bem como quantificar os ativos em outros estudos relacionados ao desenvolvimento de formulações dermatológicas contendo IMQ e TBF.

5.1.5 Precisão

A precisão de um método analítico é a avaliação da proximidade entre os resultados obtidos em análises repetidas e independentes realizadas com o mesmo método (ANVISA, 2017; ICH, 2023). A precisão dos métodos foi expressa em termos de repetibilidade e de precisão intermediária. A repetibilidade é a avaliação das amostras produzidas sob as mesmas condições de operação, pelo mesmo analista e com a mesma instrumentação, em uma única corrida analítica. Enquanto isso, a precisão intermediária é a expressão da proximidade dos resultados obtidos por meio da análise da mesma amostra, no mesmo laboratório, em pelo menos dois dias distintos, realizada por operadores distintos (ANVISA, 2017).

Os resultados de precisão foram expressos por meio do coeficiente de variação, parâmetro amplamente empregado para avaliar a dispersão relativa dos dados experimentais. Nos ensaios de repetibilidade (Tabela 6), os valores dos coeficientes de variação do IMQ nas diferentes concentrações avaliadas foram inferiores a 5%, enquanto, para a TBF, os coeficientes permaneceram inferiores a 2%, evidenciando excelente consistência intraensaio. Na avaliação da precisão intermediária (Tabela 7), os coeficientes de variação foram inferiores a 3% para o IMQ e permaneceram abaixo de 5% para a TBF, atendendo aos critérios de aceitabilidade estabelecidos pelas diretrizes internacionais para validação de métodos analíticos, que recomendam variação inferior a 5% para métodos quantitativos (ICH, 2023; ANVISA, 2017).

Portanto, esses resultados demonstram adequada reprodutibilidade do método, tanto sob as mesmas condições operacionais quanto em condições variáveis de análise (dias, analistas ou equipamentos), confirmando a confiabilidade para aplicação em estudos de permeação cutânea e na quantificação de IMQ e TBF nas diferentes camadas da pele.

Tabela 6. Precisão mensurada pela repetibilidade dos métodos analíticos de IMQ e de TBF. IMQ – imiquimode; CV – coeficiente de variação; TBF – cloridrato de terbinafina.

Repetibilidade		
Concentração Teórica(µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	CV (%)
IMQ		
0,05	0,05 ± 0,002	4,48
0,5	0,52 ± 0,012	2,25
1,0	1,06 ± 0,015	1,38
TBF		
0,25	0,24 ± 0,005	1,94
1,0	1,02 ± 0,008	0,79
2,0	2,05 ± 0,018	1,38

Tabela 7. Resultados dos experimentos de precisão analisados por CLAE-FL para a determinação de IMQ e TBF, com precisão intermediária em solução padrão. IMQ – imiquimode; TBF – cloridrato de terbinafina; CV – coeficiente de variação; EC - estrato córneo; PR – pele remanescente.

Precisão intermediária			
Analista	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	CV (%)
IMQ			
Dia 1 (n=9)			
1	0,05	0,05 ± 0,00	0,008
	0,5	0,49 ± 0,01	1,93
	1,0	1,01 ± 0,01	0,79
2	0,05	0,05 ± 0,00	0,39
	0,5	0,5 ± 0,01	1,99
	1,0	1,0 ± 0,01	0,65
Dia 2 (n=9)			
1	0,05	0,05 ± 0,00	1,81
	0,5	0,49 ± 0,01	2,45
	1,0	1,03 ± 0,03	2,65
2	0,05	0,05 ± 0,00	1,12
	0,5	0,49 ± 0,01	2,02
	1,0	1,0 ± 0,02	1,70
TBF			
Dia 1 (n=9)			
1	0,25	0,26 ± 0,00	1,05
	1,0	1,04 ± 0,04	4,36
	2,0	2,10 ± 0,04	2,12
2	0,25	0,25 ± 0,00	0,91
	1,0	1,02 ± 0,01	1,50
	2,0	2,10 ± 0,07	3,55
Dia 2 (n=9)			
1	0,25	0,26 ± 0,00	1,60
	1,0	0,98 ± 0,04	3,98
	2,0	2,10 ± 0,04	1,82
2	0,25	0,26 ± 0,01	3,39
	1,0	0,96 ± 0,03	2,93
	2,0	2,08 ± 0,09	4,14

5.1.6 Exatidão

A exatidão do método analítico foi avaliada em termos de recuperação dos fármacos a partir das camadas da pele (EC e PR). O ensaio de recuperação permite avaliar a capacidade

extratora do solvente utilizado e padronizar o método de extração, garantindo que a quantidade de fármaco que penetrou nas camadas da pele seja adequadamente recuperada e quantificada. Considerando que os fármacos podem interagir de maneiras distintas com os componentes da matriz biológica, torna-se essencial verificar a exatidão do método após o processo de extração dos fármacos (ICH, 2023).

Os resultados de exatidão Tabela 8 demonstraram recuperação adequada para ambos os fármacos nas diferentes matrizes cutâneas avaliadas. Para o IMQ, os valores de recuperação variaram entre $79,0 \pm 0,4\%$ e $105,1 \pm 1,5\%$, enquanto, para a TBF, situaram-se entre $88,5 \pm 2,2\%$ e $103,5 \pm 0,4\%$, a depender da concentração teórica e da camada da pele analisada. Além disso, os coeficientes de variação permaneceram inferiores a 5% em todas as matrizes biológicas, o que está de acordo com os limites estabelecidos pelas diretrizes de validação de métodos analíticos (ICH, 2023). Esse resultado permite a eliminação do fator de correção durante os experimentos de permeação, uma vez que a literatura para estudos de absorção cutânea aceita taxas de recuperação do fármaco pela pele acima de 70% (REIS *et al.*, 2018).

Tendo em vista que um dos objetivos desse trabalho é a validação de um método a ser utilizado em estudos voltados ao desenvolvimento de uma nova formulação para o tratamento da CBM, a PR constitui a matriz de maior interesse nos ensaios. Ambos os fármacos apresentam resultados em termos de recuperação acima de 80% na PR, demonstrando a eficiência do método.

Tabela 8. Valores de recuperação de IMQ e de TBF quantificados nas diferentes camadas da pele, por extração com metanol durante 24 horas. IMQ – imiquimode; TBF – cloridrato de terbinafina. EC – estrato córneo; PR – pele remanescente.

Matriz biológica	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	CV (%)	Recuperação (%)
IMQ				
EC	0,1	$0,08 \pm 0,00$	0,54	$79,03 \pm 0,40$
	0,5	$0,43 \pm 0,01$	3,56	$86,02 \pm 3,06$
	1,0	$0,93 \pm 0,02$	2,77	$84,55 \pm 4,93$
PR	0,1	$0,09 \pm 0,00$	5,30	$91,91 \pm 4,93$
	0,5	$0,53 \pm 0,01$	1,42	$105,11 \pm 1,50$
	1,0	$0,99 \pm 0,03$	3,32	$98,52 \pm 3,28$
TBF				
EC	0,5	$0,51 \pm 0,02$	3,19	$101,35 \pm 3,23$
	1,0	$0,92 \pm 0,03$	3,13	$91,86 \pm 2,88$
	2,0	$1,77 \pm 0,04$	2,53	$88,49 \pm 2,24$
PR	0,5	$0,51 \pm 0,00$	0,96	$104,89 \pm 3,60$
	1,0	$1,03 \pm 0,00$	0,36	$103,46 \pm 0,37$
	2,0	$1,88 \pm 0,09$	4,91	$93,90 \pm 4,61$

5.2 SOLUBILIDADE DE IMQ E TBF

A determinação da solubilidade do fármaco é fundamental para a condução de ensaios *in vitro* que envolvem difusão de moléculas, como os de liberação e de permeação cutânea. A partir desses dados, é possível verificar se o experimento será realizado dentro das condições *sink*, assegurando que a concentração dos fármacos no meio receptor permaneça inferior à sua solubilidade, evitando a saturação e garantindo a manutenção do gradiente de concentração necessário para a difusão (LIU *et al.*, 2013b). Na Tabela 9 são apresentados os valores de solubilidade obtidos para o IMQ e a TBF nos diferentes meios avaliados.

Tabela 9. Solubilidade de IMQ e TBF em diferentes meios. Resultados apresentados como média $\pm$ DP; N = 3. IMQ – imiquimode; TBF – cloridrato de terbinafina.

Meios de solubilização	Solubilidade IMQ (g/L)	Solubilidade TBF (g/L)
Tampão fosfato pH 7,4 com 1,0% de Tween [®] 80	0,01 $\pm$ 0,00	0,58 $\pm$ 0,07
Tampão fosfato pH 7,4 com 2,5% de Tween [®] 80	0,01 $\pm$ 0,00	0,83 $\pm$ 0,02
Tampão fosfato pH 7,4 com 5,0% de Tween [®] 80	0,02 $\pm$ 0,00	0,80 $\pm$ 0,05
Tampão fosfato pH 6,0 com 1,0% de Tween [®] 80	0,10 $\pm$ 0,00	4,07 $\pm$ 0,17
Tampão fosfato pH 6,0 com 2,5% de Tween [®] 80	0,19 $\pm$ 0,01	8,04 $\pm$ 0,11
Tampão fosfato pH 6,0 com 5,0% de Tween [®] 80	0,15 $\pm$ 0,0	7,01 $\pm$ 0,23
Tampão fosfato pH 5,5	0,96 $\pm$ 0,09	10,26 $\pm$ 0,47
Tampão fosfato pH 5,5 com 1,0% de Tween [®] 80	0,64 $\pm$ 0,01	13,32 $\pm$ 0,50
Tampão fosfato pH 5,5 com 2,5% de Tween [®] 80	0,51 $\pm$ 0,01	12,19 $\pm$ 0,48
Tampão fosfato pH 5,5 com 5,0% de Tween [®] 80	0,55 $\pm$ 0,01	16,20 $\pm$ 0,53
Tampão acetato pH 5,5 com 1% de Tween [®] 80	0,93 $\pm$ 0,05	8,32 $\pm$ 0,21
Tampão acetato pH 5,5 com 2,5% de Tween [®] 80	1,16 $\pm$ 0,06	10,30 $\pm$ 0,05
Tampão acetato pH 5,5 com 5,0% de Tween [®] 80	0,49 $\pm$ 0,03	16,52 $\pm$ 0,16
Tampão acetato pH 4,0	39,67 $\pm$ 2,55	11,75 $\pm$ 0,22
Tampão acetato pH 4,0 com 1,0% de Tween [®] 80	14,12 $\pm$ 1,41	34,54 $\pm$ 1,58
Tampão acetato pH 4,0 com 2,5% de Tween [®] 80	13,31 $\pm$ 0,66	19,34 $\pm$ 0,09
Tampão acetato pH 4,0 com 5,0% de Tween [®] 80	2,13 $\pm$ 0,09	27,69 $\pm$ 0,20

Como o IMQ e a TBF apresentam baixa solubilidade em meio aquoso (GHEZZI *et al.*, 2021; TELÒ *et al.*, 2016). Foi avaliada a adição do tensoativo Tween[®]80 ao tampão fosfato e ao tampão acetato, com objetivo de aumentar a solubilidade dos fármacos no meio receptor.

Observou-se aumento da solubilidade dos fármacos em pH mais ácido, especialmente em tampão acetato pH 4,0, comportamento esperado por tratarem-se de bases fracas, que apresentam maior solubilidade quando protonadas (SACHDEVA *et al.*, 2010; TELÓ *et al.*, 2017). A adição de Tween®80 também influenciou a solubilidade, porém de maneira dependente do fármaco e do meio. Para a TBF, observou-se, de modo geral, aumento da solubilidade na presença do tensoativo. Por outro lado, para o IMQ, especialmente em meios ácidos, a adição de Tween®80 não proporcionou o mesmo efeito e, em alguns casos, promoveu sua redução em relação ao meio sem tensoativo.

Verificou-se que as concentrações testadas de tensoativo (1,0, 2,5 e 5,0%) aumentaram a solubilidade da TBF em tampão acetato pH 4,0, provavelmente devido à sua maior lipofilicidade e à incorporação no núcleo hidrofóbico das micelas formadas, no entanto, para o IMQ esse efeito foi menos pronunciado, possivelmente porque o fármaco já se encontrava na forma ionizada em meio ácido, apresentando maior solubilidade aquosa e menor afinidade pela fase contendo o tensoativo.

Dessa forma, com base na Tabela 9, optou-se pelo tampão acetato pH 4,0 sem Tween®80, pois esse meio apresentou a maior solubilidade para o IMQ, que foi o fármaco limitante em meios menos ácidos. Além disso, a TBF apresentou solubilidade elevada nesse meio, garantindo condições de *sink* para ambos os fármacos no volume do receptor utilizado. A escolha do meio sem tensoativo também reduz potenciais interferências do Tween®80 no sistema e simplifica a realização dos ensaios.

Tendo em vista que, para o ensaio proposto, a massa de fármaco no compartimento doador da célula não excede 3000 µg e o compartimento receptor tem 15 mL, caso todo o fármaco passasse do compartimento doador para o meio receptor, a concentração final seria de 200 µg/mL (0,2 g/L). Caso ocorresse transferência total do fármaco, o que seria aproximadamente 10 vezes inferior à solubilidade do fármaco nesse meio. Portanto, as condições de *sink* são mantidas no meio selecionado.

5.3 ESTABILIDADE ANALÍTICA DE IMQ E TBF

A preparação e o armazenamento de amostras são etapas fundamentais em análises por CLAE-FL, técnica altamente sensível, uma vez que pequenas interferências, como produtos de degradação dos próprios analitos, podem ser detectadas e comprometer a análise. Além disso, a avaliação da estabilidade do IMQ e da TBF nos meios selecionados para o estudo é essencial para garantir a confiabilidade dos resultados, evitando que a possível degradação dos fármacos comprometa os resultados obtidos.

A estabilidade dos fármacos foi avaliada no tampão acetato pH 4,0 por um período de 24 horas. Adicionalmente, foi realizada a avaliação da estabilidade das soluções estoque preparadas em metanol, armazenadas em geladeira ($\pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) e em temperatura ambiente, ao longo de 30 dias.

Os dados apresentados na Tabela 10 demonstram a estabilidade dos IMQ e TBF em tampão de acetato de sódio, pH 4,0, ao longo de 24 horas, período correspondente ao tempo máximo dos ensaios de liberação e de penetração cutânea. Os valores de teor permanecem próximos ao tempo inicial, sem variações expressivas ao longo do período avaliado. A análise estatística não evidenciou diferença significativa entre os tempos avaliados ($p > 0,05$), reforçando a estabilidade em tampão acetato pH 4,0 durante o período experimental. Dessa forma, não foram observadas evidências de degradação significativa nas condições avaliadas, sugerindo que o tampão acetato pH 4,0 é adequado como meio receptor para os ensaios de liberação e penetração cutânea.

Tabela 10. Estabilidade da solução de IMQ e TBF em tampão acetato pH 4,0, considerando o tempo inicial por até 24 horas após o preparo da solução. IMQ – imiquimode; TBF – cloridrato de terbinafina.

Teor de IMQ (%)				
0 horas	3 horas	6 horas	12 horas	24 horas
90,3 $\pm$ 2,0	91,5 $\pm$ 0,3	92,9 $\pm$ 0,3	92,2 $\pm$ 0,2	91,9 $\pm$ 0,2
Teor de TBF (%)				
0 horas	3 horas	6 horas	12 horas	24 horas
102,4 $\pm$ 0,8	105,0 $\pm$ 2,2	105,2 $\pm$ 1,5	105,9 $\pm$ 2,4	105,0 $\pm$ 1,3

As soluções de IMQ e TBF preparadas em metanol foram avaliadas quanto à estabilidade por até 30 dias, quando armazenadas sob refrigeração ($\pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) e em temperatura ambiente (Tabela 11). Para a TBF, as amostras mantidas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ permaneceram estáveis durante todo o período avaliado, não apresentando redução do teor ao longo dos 30 dias. Em temperatura ambiente, observou-se diferença estatisticamente significativa apenas no dia 30 ($p \leq 0,05$) em relação ao dia inicial, entretanto, os valores permaneceram próximos de 100%, não caracterizando degradação relevante.

Em relação ao IMQ, as amostras armazenadas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ apresentaram aumento significativo do teor a partir do dia 25 ($p \leq 0,05$). Em temperatura ambiente, a estabilidade foi mantida até o dia 10 ($p \leq 0,01$), sendo observada elevação do teor nos tempos posteriores. Esse aumento, observado para ambos os fármacos em períodos mais prolongados, pode estar relacionado à

possível evaporação parcial do metanol durante o armazenamento, levando à concentração da solução, e não necessariamente à degradação química dos analitos.

De forma geral, não foi observada redução progressiva dos teores ao longo do período estudado, indicando que as soluções-estoque mantêm estabilidade analítica por até 25 dias sob refrigeração e por períodos mais curtos em temperatura ambiente.

Tabela 11. Estabilidade do IMQ e TBF em amostras armazenadas em geladeira ($\pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) e em temperatura ambiente por até 30 dias após o preparo em metanol, para avaliar a estabilidade analítica.

Teor de IMQ (%)							
	<i>Dia 0</i>	<i>Dia 5</i>	<i>Dia 10</i>	<i>Dia 15</i>	<i>Dia 20</i>	<i>Dia 25</i>	<i>Dia 30</i>
4 °C	101,8 $\pm$ 1,1	102,7 $\pm$ 0,3	101,8 $\pm$ 0,9	102,2 $\pm$ 4,5	102,9 $\pm$ 3,7	108,8 $\pm$ 0,3	106,0 $\pm$ 0,5
Temperatura ambiente	100,8 $\pm$ 0,3	101,8 $\pm$ 0,8	103,3 $\pm$ 0,6	103,1 $\pm$ 0,2	105,9 $\pm$ 0,1	108,7 $\pm$ 0,3	107 $\pm$ 0,5
Teor de TBF (%)							
	<i>Dia 0</i>	<i>Dia 5</i>	<i>Dia 10</i>	<i>Dia 15</i>	<i>Dia 20</i>	<i>Dia 25</i>	<i>Dia 30</i>
4 °C	102,2 $\pm$ 0,1	99,2 $\pm$ 0,5	102,1 $\pm$ 2,3	103,4 $\pm$ 2,5	101,7 $\pm$ 3,1	107,8 $\pm$ 3,0	104,1 $\pm$ 0,8
Temperatura ambiente	99,3 $\pm$ 1,1	101,3 $\pm$ 0,5	101,4 $\pm$ 3,4	101,2 $\pm$ 3,2	101,0 $\pm$ 4,5	105,8 $\pm$ 1,6	107,0 $\pm$ 0,9

5.4 ESTUDO DE COMPATIBILIDADE ENTRE OS FÁRMACOS E EXCIPIENTES DO FILME

5.4.1 Estudos in silico de dinâmica e reatividade molecular

As análises computacionais foram realizadas no Laboratório de Dinâmica e Reatividade Molecular (LDRM), do Instituto de Química (IQ), da Universidade de Brasília (UnB), em colaboração com o referido grupo de pesquisa.

Inicialmente, foram determinadas as formas predominantes de ocorrência do IMQ e TBF em condições fisiológicas (pH 7,4; T = 310,15 K), utilizando o MarvinSketch para predição de estados de protonação e populações relativas. Essa etapa é relevante porque a ionização influencia diretamente as propriedades de partição, solvatação e, consequentemente, a permeação e a interação com matrizes poliméricas.

Observou-se que o IMQ apresenta uma forma majoritária, com aproximadamente 91,25% da população relativa, indicando um comportamento molecular estável nessas condições. A TBF apresentou distribuição menos acentuada, com cerca de 61,23% da espécie predominante, sugerindo possível influência do meio sobre a forma estrutural (Figura 20).

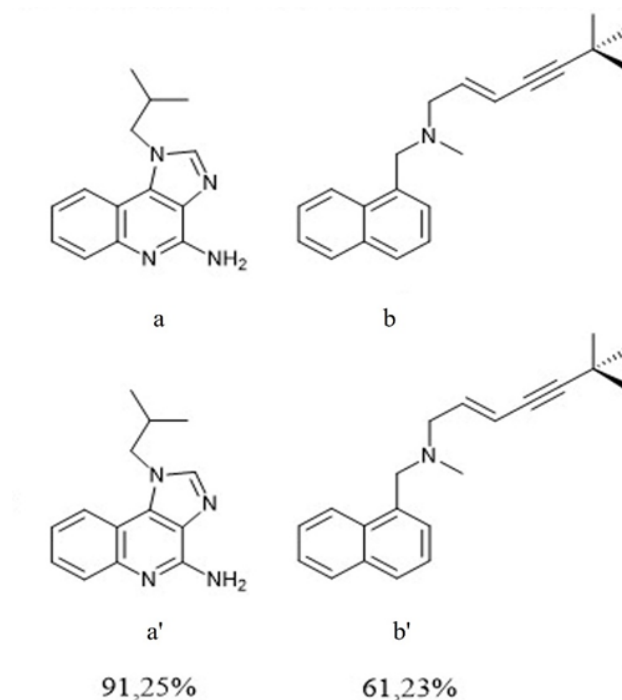


Figura 20. Estruturas moleculares de IMQ (a) e de TBF (b), bem como suas respectivas formas predominantes em condições fisiológicas (a' e b'; pH 7,4; 310,15 K). IMQ – imiquimode e TBF – cloridrato de terbinafina. Fonte: Autoria própria.

Esse resultado indica que ambos os fármacos mantêm formas estáveis em pH fisiológico, não sendo observada formação relevante de espécies aniônicas ou reativas. Essa estabilidade é importante para garantir a previsibilidade do comportamento dos ativos após a aplicação tópica em lesões de CBM.

Também foram avaliados parâmetros físico-químicos preditivos para o IMQ e a TBF, conforme apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Parâmetros físico-químicos para IMQ e TBF: logaritmo da constante de partição (logKp), logaritmo do coeficiente de distribuição (logD) e área da superfície polar topológica (TPSA, Å²). IMQ – imiquimode; TBF – cloridrato de terbinafina.

Fármaco	logKp	logD	TPSA
IMQ	2,65	2,59	56,73
TBF	5,53	5,20	3,24

Valores elevados de logD e logKp indicam maior lipofilicidade e maior tendência à permeação por membranas lipídicas (ERTL; ROHDE; SELZER, 2000). Nesse contexto, observa-se que a TBF apresenta valores significativamente superiores aos do IMQ, o que indica um caráter altamente lipofílico.

O parâmetro TPSA está relacionado à polaridade molecular e à capacidade de interação com o meio aquoso. De forma geral, valores de TPSA inferiores a 140 Å² estão associados a

boa permeabilidade oral (VEBER *et al.*, 2002), enquanto valores mais baixos favorecem difusão passiva através de membranas biológicas (KELDER *et al.*, 1999). A TBF apresentou TPSA extremamente reduzida (3,24 Å²), reforçando seu perfil altamente hidrofóbico e seu maior potencial de permeação em tecidos ricos em lipídios. O IMQ, por sua vez, apresentou TPSA intermediária (56,73 Å²), indicando um perfil mais equilibrado entre polaridade e lipofilicidade.

No contexto do filme polimérico desenvolvido, esses resultados são relevantes. A elevada lipofilicidade da TBF justifica a necessidade de estratégias de solubilização na matriz, como o uso de ácido oleico, a fim de favorecer a dispersão homogênea. Já o perfil intermediário do IMQ pode facilitar a interação com a matriz hidrofílica de quitosana e PVA, contribuindo para uma distribuição mais uniforme no sistema.

Considerando que a CBM é uma infecção subcutânea crônica que exige penetração adequada do antifúngico no tecido infectado (QUEIROZ-TELLES; SANTOS, 2013), o alto logD e logKp da TBF podem favorecer sua difusão local após aplicação tópica.

As simulações de metadinâmica (Figura 21) indicaram ausência de interações reativas entre o IMQ e TBF nas condições avaliadas, sugerindo compatibilidade química preliminar entre os fármacos em meio aquoso (LAIO; PARRINELLO, 2002; NOSÉ, 1984; HOOVER, 1985; EVANS; HOLIAN, 1985).

Essa concordância entre a modelagem molecular e a caracterização térmica reforça a evidência de compatibilidade físico-química entre IMQ e TBF. Tal compatibilidade é fundamental para assegurar a estabilidade da formulação, a uniformidade do teor e a previsibilidade do perfil de liberação. A ausência de interação química relevante indica que a associação dos fármacos na mesma matriz polimérica não implica risco de degradação mútua ou de modificação estrutural que comprometa sua eficácia terapêutica. Os achados computacionais apresentam forte correlação com os resultados experimentais obtidos por calorimetria exploratória diferencial (DSC) e por análise termogravimétrica (TGA).

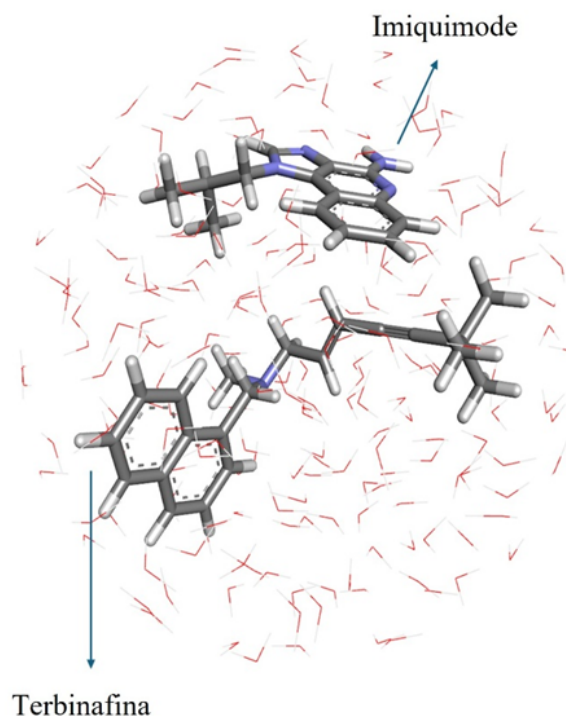


Figura 21. Descrição inicial dos ambientes de solvatação para os pares IMQ e TBF. Ambos os ambientes contêm, além dos pares de fármacos, 200 moléculas de água. IMQ – imiquimode e TBF – cloridrato de terbinafina.

5.4.2 Análise de compatibilidade entre IMQ e TBF

O estudo de compatibilidade entre o IMQ, a TBF e os demais componentes da formulação constitui uma etapa fundamental na avaliação da estabilidade físico-química do sistema de liberação desenvolvido. O processo de produção dos filmes envolve o aquecimento de seus componentes e dos fármacos IMQ e TBF. A caracterização térmica prévia dos componentes isolados e de suas misturas físicas permite identificar, de forma preditiva, possíveis eventos de degradação ou de interação que comprometam a estabilidade dos fármacos durante a fabricação e o armazenamento. Excipientes farmacêuticos podem interagir de forma química ou física com fármacos, induzindo polimorfismo em interações de natureza física ou degradação em interações de natureza química, ambas com potencial de impacto sobre a eficácia e a segurança da formulação (DANIEL *et al.*, 2021).

Portanto, para verificar a compatibilidade entre os ativos e os excipientes, realizou-se a análise térmica dos fármacos isolados e em misturas físicas binárias, por meio de DSC e TG. Para isso, foram analisados o IMQ, a TBF, a quitosana, o PVA, a glicerina e o ácido oleico, isoladamente e em misturas binárias fármaco–excipiente, bem como as formulações finais F-C17 e F-C18.

Quanto às análises de TGA, foi possível identificar os eventos de decomposição térmica de cada componente e de suas misturas físicas. A Figura 22 apresenta as curvas da primeira

derivada da perda de massa (DrTGA), que conferem maior resolução na identificação das temperaturas de máxima taxa de decomposição de cada componente.

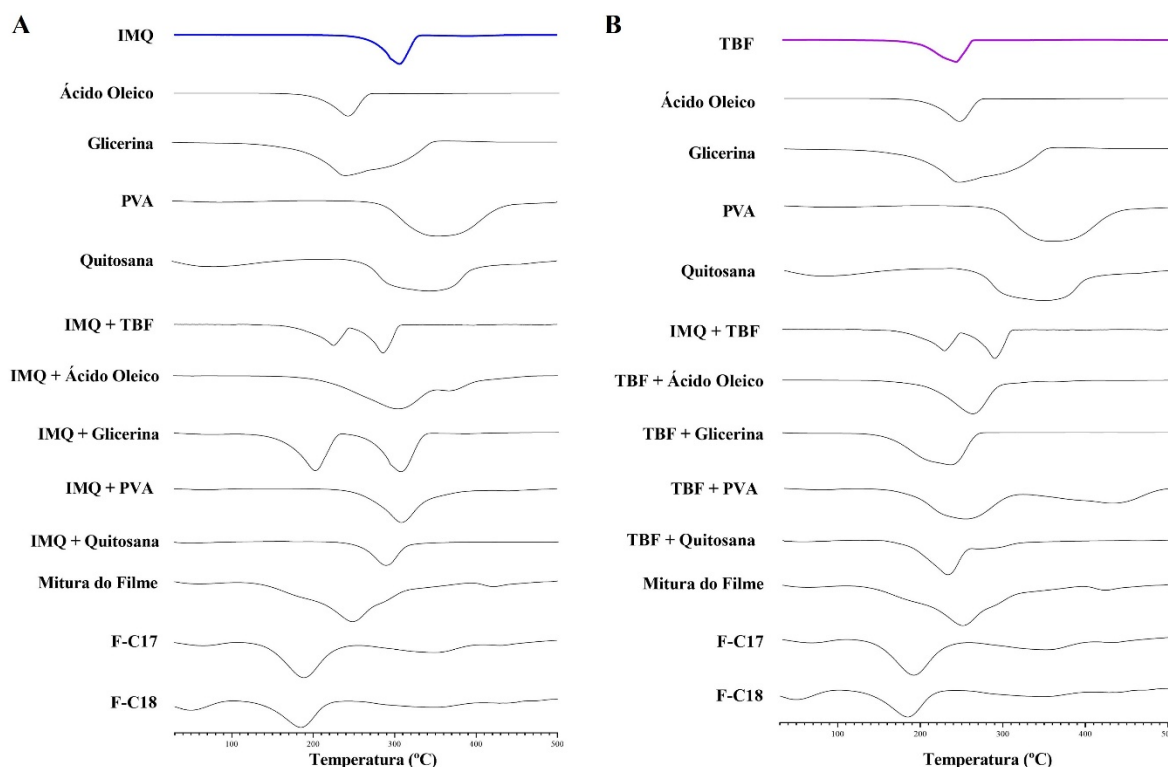


Figura 22. Primeira derivada de análises termogravimétricas (DrTGA) de IMQ (A), TBF (B) da mistura física dos componentes dos filmes e dos filmes prontos F-C17 e F-C18. Cada evento de perda de massa é indicado em porcentagem (%). IMQ - imiquimode; TBF - cloridrato de terbinafina; PVA - álcool polivinílico; F-C17 - filme contendo imiquimode e cloridrato de terbinafina com 1% de ácido oleico; F-C18 – filme contendo imiquimode e cloridrato de terbinafina com 2% de ácido oleico. Fonte: Autoria própria.

O termograma do IMQ não apresenta perda de massa expressiva abaixo de 280 °C, evidenciando ausência de umidade higroscópica associada e elevada estabilidade térmica até temperaturas muito superiores às empregadas no processo de preparo dos filmes (40 °C). A decomposição térmica do IMQ ocorre de forma abrupta em torno de 300–310 °C, em um evento único e bem definido, comportamento consistente com a degradação de compostos heteroaromáticos cristalinos após a fusão, fenômeno amplamente descrito para imidazoquinolinas (EL-KAMEL; ASHRI; ALSARRA, 2007; KONDOROS *et al.*, 2022).

De forma semelhante, o termograma da TBF apresenta início de perda de massa em torno de 200 °C, compatível com o processo de fusão do sal cloridrato cujo ponto de fusão está estabelecido entre 203 e 205 °C, seguido de decomposição térmica progressiva. Esse padrão de fusão seguida de decomposição é característico de sais orgânicos de aminas com cadeias alifáticas insaturadas e núcleos aromáticos, nos quais a perda de integridade estrutural se inicia

imediatamente acima da temperatura de fusão (HASSAN *et al.*, 2023; KANAKAPURA; PENMATSA, 2016).

Os excipientes analisados apresentam comportamentos térmicos distintos entre si. O ácido oleico exibe perda de massa em temperatura relativamente baixa, inferior a 200 °C, associada à volatilização e ao início da degradação oxidativa do ácido graxo insaturado (PETROVÁ *et al.*, 2023). A glicerina demonstra perda de massa ampla entre aproximadamente 200 e 300 °C, decorrente de sua evaporação progressiva e subsequente decomposição. O PVA apresenta um evento largo entre 250 e 350 °C, correspondente à eliminação de grupos acetato residuais e à degradação das cadeias polivinílicas. A quitosana exibe dois eventos: desidratação estrutural entre 50 e 120 °C, e degradação da cadeia glicosídica com ruptura das ligações β -(1 $\rightarrow$ 4) entre 250 e 320 °C comportamento amplamente documentado para biopolímeros naturais (EL-KAMEL; ASHRI; ALSARRA, 2007; LAYEK *et al.*, 2019).

Nas misturas físicas binárias, os eventos de decomposição característicos do IMQ e da TBF permanecem identificáveis em todas as combinações avaliadas, na mesma faixa de temperatura observada para os fármacos isolados. Não se observa o surgimento de novos eventos de decomposição, nem a antecipação ou a supressão significativa dos eventos individuais. As variações discretas de intensidade e o leve alargamento são atribuídos à diluição das massas dos componentes e à sobreposição de eventos térmicos individuais, e não a interações químicas relevantes (ROJEK; WESOLOWSKI, 2022).

Nas formulações finais F-C17 e F-C18, os eventos individuais estão fortemente atenuados e alargados, reflexo da dispersão dos fármacos na matriz polimérica, sem evidência de novos produtos de decomposição. Esses resultados indicam boa compatibilidade térmica entre o IMQ, a TBF e todos os excipientes empregados na formulação dos filmes poliméricos (EL-KAMEL; ASHRI; ALSARRA, 2007; HASSAN *et al.*, 2023; ROJEK; WESOLOWSKI, 2022).

A análise térmica por DSC é uma ferramenta essencial no rastreamento de incompatibilidades em misturas farmacêuticas, permitindo a identificação de interações físico-químicas por meio da análise de eventos endotérmicos e exotérmicos associados a transições de fase como fusão, decomposição e transformações polimórficas (JAMSHAD *et al.*, 2022; KONDOROS *et al.*, 2022). Considerando que os resultados de TGA não indicaram evidências de incompatibilidade entre os componentes da formulação, a avaliação por DSC foi conduzida com foco nos fármacos IMQ e TBF analisados isoladamente, em mistura binária (IMQ + TBF),

na mistura física de todos os componentes do filme e nas formulações finais F-C17 e F-C18. Os termogramas obtidos são apresentados na Figura 23.

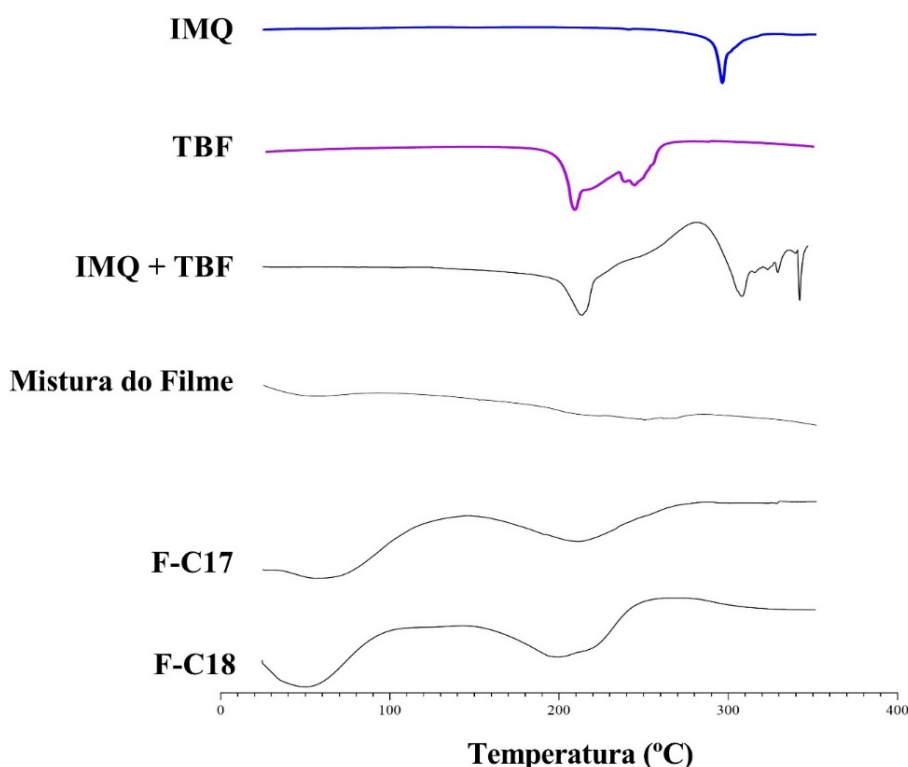


Figura 23. Termogramas obtidos por análise de DSC de IMQ e TBF, da mistura dos componentes do filme e dos filmes prontos F-C17 e F-C18. Taxa de aquecimento de 10 °C/min, de 25 a 400 °C, sob amostra controlada de nitrogênio (50 mL/min). IMQ – imiquimode; TBF – cloridrato de terbinafina; F-C17 – filme contendo imiquimode e cloridrato de terbinafina com 1% de ácido oleico; F-C18 – filme contendo imiquimode e cloridrato de terbinafina com 2% de ácido oleico. Fonte: Autoria própria.

O termograma do IMQ isolado exibe um pico endotérmico agudo e simétrico em torno de 290 °C, com temperatura de pico entre 295 e 300 °C, correspondente ao processo de fusão do fármaco (Figura 23). A nitidez e a simetria desse evento confirmam a natureza essencialmente cristalina do IMQ e são indicativas de elevada pureza da amostra. Esse comportamento é esperado para a estrutura imidazoquinolínica do fármaco (LAYEK *et al.*, 2019; RAMINENI *et al.*, 2013; SORGI *et al.*, 2024; THATAI; SAPRA, 2018). O termograma da TBF isolada apresenta dois eventos endotérmicos distintos. O primeiro evento, de menor magnitude, ocorre em torno de 200 °C, compatível com o processo de fusão do sal, cujo ponto de fusão é de 203 a 205 °C (KANAKAPURA; PENMATSA, 2016; KUMINEK *et al.*, 2013). O segundo evento endotérmico, de maior intensidade, observado entre 240 e 255 °C, corresponde ao início da decomposição térmica do material, esperado para alilaminas com cadeias alifáticas insaturadas, nas quais ocorre degradação térmica progressiva sob aquecimento contínuo (HASSAN *et al.*, 2023; HOSSAIN *et al.*, 2019).

Na mistura binária (IMQ + TBF), observa-se a supressão do pico endotérmico de fusão da TBF, identificável em torno de 200–215 °C no fármaco isolado, com surgimento de eventos térmicos de morfologia irregular na faixa de 220–280 °C, atribuídos à sobreposição da fusão ao início de sua decomposição térmica, fenômeno que ocorre nessa faixa de temperatura mesmo quando o fármaco é analisado isoladamente. O evento endotérmico do IMQ, em torno de 295–300 °C, permanece identificável, embora com atenuação de intensidade e alargamento, decorrentes da diluição da massa do componente na mistura (ALMOMEN *et al.*, 2023; JAMSHAIID H. *et al.*, 2022; KIM *et al.*, 2023; KONDOROS *et al.*, 2022).

A ausência de deslocamentos significativos nas temperaturas características de fusão, bem como a inexistência de novos eventos endotérmicos ou exotérmicos, sugere que não ocorrem interações químicas relevantes entre os fármacos nas condições avaliadas. Esses resultados indicam que a associação entre IMQ e TBF não promove alterações estruturais detectáveis por DSC. Nas formulações F-C17 e F-C18 os termogramas exibem eventos endotérmicos amplos e de baixa intensidade, sem picos agudos atribuíveis à fusão de nenhum dos fármacos, indicando a dispersão dos fármacos na rede polimérica de quitosana–PVA (KIM *et al.*, 2023; JAMSHAIID *et al.*, 2022). Assim, a ausência de novos picos endotérmicos ou exotérmicos inesperados nas formulações finais confirma que o processo de fabricação dos filmes não induziu degradação química dos fármacos nem gerou produtos de interação entre os componentes.

5.4.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A técnica FTIR foi utilizada para avaliar a ocorrência ou não de interações entre as moléculas dos fármacos utilizados no preparo dos filmes, com base em resultados anteriores de análise térmica, fornecendo dados mais precisos sobre possíveis incompatibilidades nas formulações. Assim, as alterações nos padrões espectrais característicos dos fármacos foram observadas por meio da sobreposição dos espectros, na qual as estruturas particulares de cada molécula podem ser identificadas. A Figura 24 apresenta os espectros de FTIR do IMQ, da TBF e da mistura binária (1:1), registrados na faixa de 4000-500 cm^{-1} .

O espectro de FTIR do IMQ exibe bandas características principalmente na região de 1700–500 cm^{-1} , além de absorções entre 3500–3000 cm^{-1} , atribuídas ao estiramento N–H associado ao sistema heteroaromático da molécula. Bandas adicionais em 3000–2850 cm^{-1} correspondem ao estiramento C–H alifático, enquanto sinais na faixa de 1700–1600 cm^{-1} são atribuídos a vibrações C=N e C=C do anel imidazoquinolínico, características estruturais do fármaco. Esses sinais são amplamente utilizados como marcadores espectrais para identificação

do IMQ e avaliação de interações em estudos de compatibilidade fármaco–excipiente (JADHAV *et al.*, 2024; KIM *et al.*, 2023).

O espectro da TBF apresenta bandas características na região de 2950–2850 cm^{-1} , atribuídas ao estiramento C–H, também é observada uma absorção característica em torno de $\sim 2220 \text{ cm}^{-1}$, atribuída ao estiramento $\text{C}\equiv\text{C}$ do sistema alquinílico presente na estrutura da TBF. Bandas adicionais entre 1600–1500 cm^{-1} são associadas às vibrações do anel aromático, enquanto sinais entre 1200–900 cm^{-1} correspondem a vibrações C–N e C–C, frequentemente reportadas em estudos espectroscópicos desse antifúngico (BAJWA *et al.*, 2023; BILIUTA *et al.*, 2025).

Ao analisar o espectro da mistura binária, observa-se que as principais bandas características de ambos os componentes permanecem presentes, sem o aparecimento de novas bandas ou o desaparecimento das bandas originais. A ausência de deslocamentos relevantes de bandas ou formação de novas absorções indica que não há evidências de interação química, como formação de novas ligações covalentes ou complexos estáveis entre o ativo e o excipiente.

Desta forma, os resultados sugerem compatibilidade entre IMQ e TBF, uma vez que os perfis espectrais da mistura correspondem essencialmente à superposição dos espectros individuais, sem alterações estruturais detectáveis.

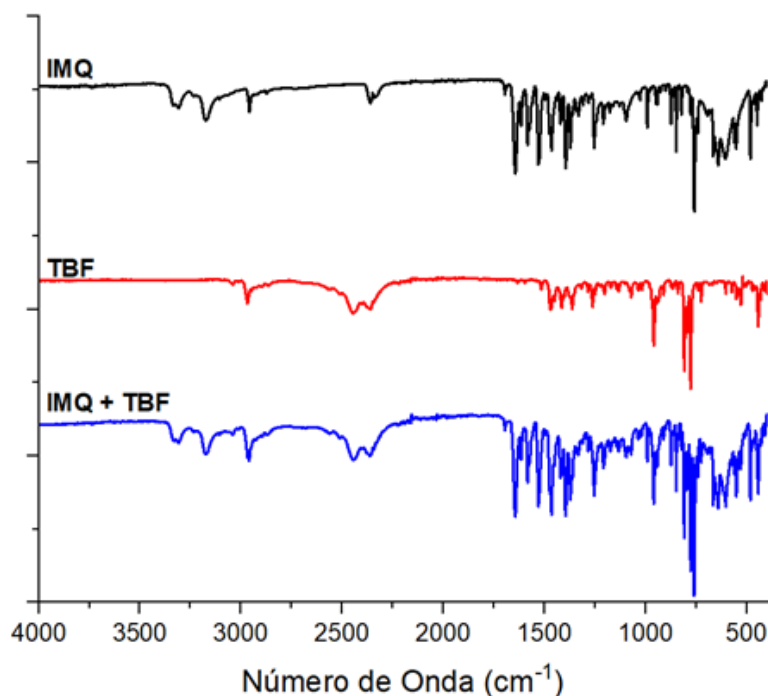


Figura 24. Espectros de FTIR de IMQ, TBF e da mistura física IMQ + TBF registrados na faixa de 4000–500 cm^{-1} . Fonte: Autoria própria. IMQ – imiquimode; TBF – cloridrato de terbinafina.

5.5 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES CONTENDO IMQ E TBF

A quitosana foi escolhida como polímero base para o desenvolvimento dos filmes devido às suas propriedades de biocompatibilidade, atoxicidade, estabilidade química e compatibilidade com diferentes classes de fármacos (BERNKOP-SCHNÜRCH; DÜNNHAUPT, 2012). Os ensaios térmicos realizados neste estudo indicaram a ausência de incompatibilidades relevantes entre a quitosana, o IMQ e a TBF, sugerindo que a incorporação dos fármacos à matriz polimérica não compromete a estabilidade físico-química dos fármacos. Além disso, a quitosana apresenta grupos amino que, em meio ácido, se encontram protonados, conferindo carga positiva ao polímero. Essa característica favorece a bioadesividade e a interação com a superfície cutânea, prolongando o tempo de permanência do filme no local de aplicação, aspecto desejável para formulações tópicas destinadas ao tratamento da CBM.

Estudos também relatam que a quitosana pode atuar como promotora de permeação cutânea (BHATTARAI; GUNN; ZHANG, 2010; KUMARI; YADAV; YADAV, 2010, RASOOL *et al.*, 2011). Adicionalmente, quitosana com grau de desacetilação superior a 75% apresenta maior quantidade de grupos amino livres, o que pode favorecer um perfil de liberação mais lento e controlado dos fármacos incorporados (THEIN-HAN; STEVENS, 2004).

O desenvolvimento dos filmes poliméricos foi conduzido de forma sequencial, visando à obtenção de uma matriz com propriedades estruturais adequadas e capaz de incorporar o IMQ e a TBF de maneira homogênea. Inicialmente, foram avaliadas diferentes concentrações de quitosana (0,5% e 1%) para investigar sua influência na formação da matriz e nas propriedades mecânicas. Considerando as características das lesões de CBM, frequentemente localizadas nos membros inferiores e com aspecto verrucoso, crostoso e irregular, buscou-se um filme com boa maleabilidade e capacidade de adaptação à superfície da pele (Figura 25).

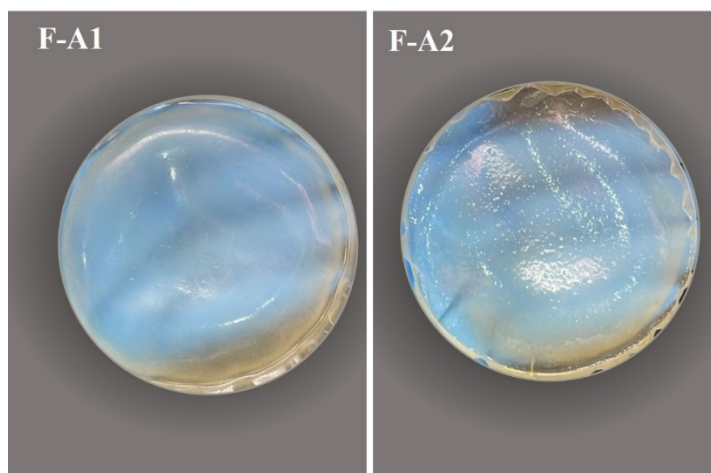


Figura 25. Aspecto macroscópico dos filmes poliméricos de quitosana obtidos por *casting*. (F-A1) quitosana 0,5% e (F-A2) quitosana 1%. Os filmes foram utilizados para avaliação visual de homogeneidade, continuidade e manuseabilidade (Formulação 1). Fonte: Autoria própria.

Os filmes contendo 1% de quitosana apresentaram maior rigidez e menor flexibilidade, o que pode dificultar a adaptação às irregularidades da pele. Em contraste, o filme contendo 0,5% de quitosana apresentou aspecto mais homogêneo, contínuo e com melhor manuseabilidade, além de maior flexibilidade, sendo, portanto, selecionado para as etapas subsequentes do desenvolvimento (Tabela 13).

Tabela 13. Avaliação macroscópica dos filmes poliméricos quanto à concentração de quitosana – formulação 1. (F-A1) 0,5% de quitosana; (F-A2) 1% de quitosana.

Aspectos Macroscópicos	F-A1	F-A2
Homogeneidade	+++	+++
Continuidade	+++	++
Manuseabilidade	+++	++
Flexibilidade	+++	++

Na etapa seguinte, foram avaliados diferentes plastificantes (PEG 400, glicerina e sorbitol) nas concentrações de 2% e 3%, com o objetivo de otimizar as propriedades mecânicas e sensoriais dos filmes (Figura 26). A adição de plastificante tem como função reduzir as interações intermoleculares entre as cadeias poliméricas, aumentando a mobilidade da matriz e, consequentemente, sua flexibilidade (AMARAL *et al.*, 2024).

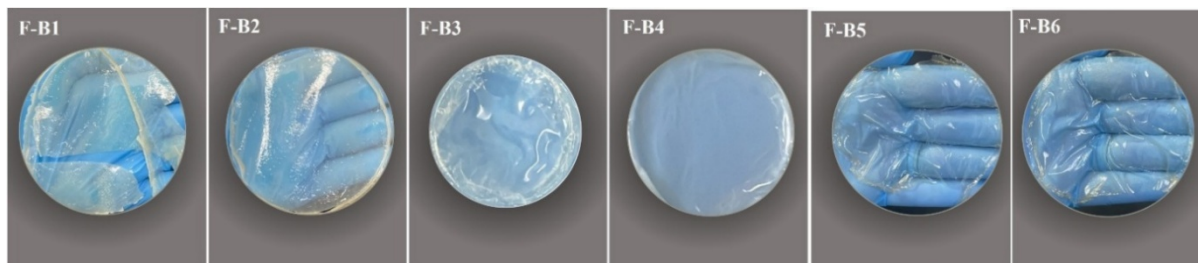


Figura 26. Aspecto macroscópico dos filmes poliméricos de quitosana obtidos por *casting*, contendo diferentes concentrações de plastificantes. (F-B1) PEG 400 2%; (F-B2) PEG 400 3%; (F-B3) glicerina 2%; (F-B4) glicerina 3%; (F-B5) sorbitol 2%; (F-B6) sorbitol 3%. Os filmes foram utilizados para avaliação visual de homogeneidade, continuidade e manuseabilidade (Formulação 2). Fonte: Autoria própria.

Observou-se que os filmes contendo glicerina a 3% apresentaram melhor desempenho macroscópico, com maior continuidade, homogeneidade e flexibilidade, quando comparados às demais formulações (Tabela 14). Os filmes contendo PEG 400 e sorbitol apresentaram menor manuseabilidade e maior rigidez, especialmente nas concentrações mais baixas, sugerindo menor eficiência na modulação das propriedades mecânicas da matriz polimérica. A escolha do plastificante considerou a necessidade de obter um filme com flexibilidade adequada, sem comprometer a integridade estrutural da matriz, garantindo qualidade sensorial e melhor adaptação às lesões cutâneas, que apresentam superfície irregular e inflamada.

Tabela 14. Avaliação macroscópica dos filmes poliméricos em relação ao plastificante – formulação 2. (F-B1) PEG 400 2%; (F-B2) PEG 400 3%; (F-B3) glicerina 2%; (F-B4) glicerina 3%; (F-B5) sorbitol 2%; (F-B6) sorbitol 3%.

Aspectos Macroscópicos	F-B1	F-B2	F-B3	F-B4	F-B5	F-B6
Homogeneidade	+	++	+++	+++	++	++
Continuidade	+	+	++	+++	+	+
Manuseabilidade	+	+	++	+++	+	+
Flexibilidade	+	+	++	+++	+	+

Todos os filmes desenvolvidos foram submetidos inicialmente à inspeção visual para avaliação de parâmetros mínimos de qualidade estabelecidos para essa forma farmacêutica. Foram analisadas características como continuidade (ausência de rupturas após secagem), homogeneidade (ausência de partículas insolúveis ou zonas de opacidade), manuseabilidade (resistência à ruptura durante o manuseio) e flexibilidade (capacidade de dobrar sem fraturar). Os filmes foram classificados qualitativamente como excelente (+++), bom (++) ou insatisfatório (+), conforme descrito nas Tabelas 13 e 14.

Na terceira etapa do desenvolvimento dos filmes, foram investigadas diferentes estratégias de solubilização e incorporação dos fármacos, considerando sua baixa solubilidade aquosa e caráter predominantemente lipofílico. Inicialmente, foram produzidos filmes contendo IMQ e TBF na concentração de 3000 µg/cm², dispersos diretamente na matriz polimérica (F-C1). Entretanto, observou-se a presença de múltiplos pontos esbranquiçados, indicativos de precipitação dos fármacos (Figura 27). Esse comportamento pode ser explicado pelas características lipofílicas do IMQ (log P = 2,6) e da TBF (log P = 5,5), que dificultam sua dispersão homogênea em sistemas predominantemente hidrofílicos, como a matriz de quitosana (JAMSHAID H. *et al.*, 2022; KANAKAPURA; PENMATSA, 2016; SACHDEVA *et al.*, 2010; TELÓ *et al.*, 2017). Em seguida, foram produzidos filmes com concentrações menores de IMQ e TBF, no entanto, houve a presença de diversos pontos correspondentes a fármaco precipitado em todas as formulações testadas. A tendência à agregação e à precipitação dos fármacos compromete a uniformidade da dose, a reprodutibilidade do filme e a estabilidade física da formulação, justificando a necessidade de estratégias adicionais de solubilização.

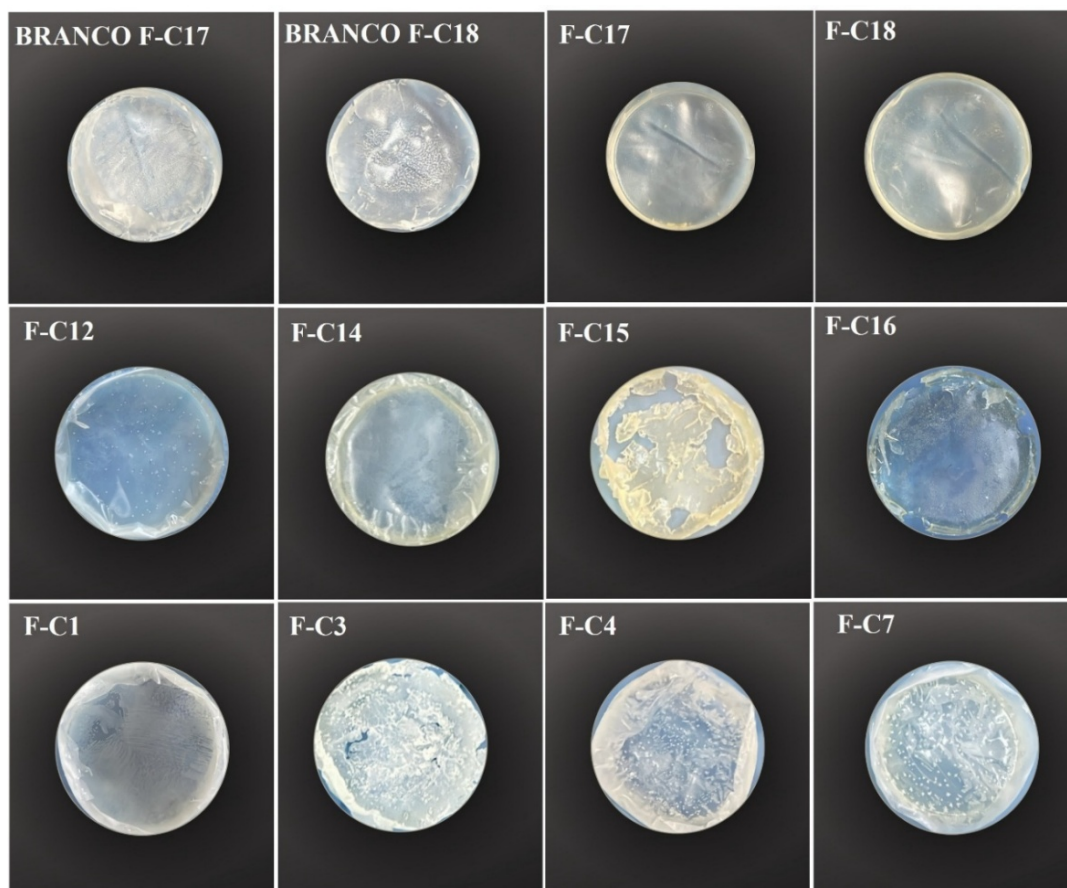


Figura 27. Aspecto macroscópico dos filmes obtidos durante a etapa de desenvolvimento da formulação, avaliando diferentes solubilizantes e técnicas de incorporação dos fármacos. As imagens correspondem às formulações que permitiram o desmolde após a secagem. Fonte: Autoria própria.

Posteriormente, foram investigadas abordagens baseadas em cosolvência, utilizando etanol isoladamente ou em combinação com tampão acetato pH 4,0, água pH 2,5 e solução de ácido acético (formulações F-C2 a F-C6). Embora o etanol seja amplamente descrito na literatura como um solvente eficiente para fármacos de baixa solubilidade aquosa, os resultados indicaram a presença de precipitado em todas as concentrações testadas, independentemente da proporção ou do ajuste de pH (TOLENTINO *et al.*, 2024).

Esses resultados sugerem que, embora a cosolvência possa promover a solubilização inicial, o sistema não apresentou estabilidade suficiente quando submetido às condições do processo de formação do filme, provavelmente devido à evaporação do solvente e à consequente supersaturação do fármaco na matriz polimérica, resultando em sua recristalização e precipitação (BILIUTA *et al.*, 2025; FREDERIKSEN; GUY; PETERSSON, 2015; LAYEK *et al.*, 2019).

Foram avaliados filmes contendo tensoativos não iônicos, como poloxamer, associados a cossolventes (F-C7 a F-C11), a fim de melhorar a dispersão e manter os fármacos

solubilizados na matriz. No entanto, os filmes obtidos apresentaram precipitação dos fármacos após a secagem ou perda de integridade mecânica. Esse comportamento pode estar relacionado à interação competitiva entre o tensoativo e o polímero, alterando a organização estrutural da matriz e prejudicando a coesão do sistema (FREDERIKSEN; GUY; PETERSSON, 2015; TOLENTINO *et al.*, 2024).

A utilização de meios aquosos acidificados, por meio de soluções de ácido acético a 1% e 2% (F-C12 e F-C13), também resultou em precipitação. Esses resultados sugerem que a simples modulação do pH, embora possa favorecer a ionização parcial do fármaco, não foi suficiente para garantir sua estabilidade no sistema polimérico, especialmente durante a etapa de evaporação do solvente (LAYEK *et al.*, 2019).

Também foram testadas estratégias baseadas em sistemas lipídicos e lipofílicos como meio para obter a solubilização de IMQ e TBF, como a microemulsão ou nanossistema lipídico incorporado à matriz (DONNELLY *et al.*, 2006; FREDERIKSEN; GUY; PETERSSON, 2015; RAMINENI *et al.*, 2013). No entanto, a incorporação desses sistemas resultou na perda da integridade mecânica dos filmes, indicando incompatibilidade entre esses sistemas coloidais e a matriz de quitosana (F-C14 e F-C15). Esse efeito pode estar associado à desorganização das interações intermoleculares da quitosana e do PVA, comprometendo a coesão e resistência estrutural do filme formado (BILIUTA *et al.*, 2025; RAMINENI *et al.*, 2013).

Dentre as estratégias avaliadas, o uso de ácido oleico como fase lipofílica apresentou resultados mais promissores. Além de apresentar elevada capacidade de solubilização para fármacos lipofílicos, o ácido oleico é descrito como promotor de permeação cutânea (DONNELLY *et al.*, 2006; RAMINENI *et al.*, 2013). Em concentrações elevadas (33%), observou-se novamente comprometimento da integridade mecânica do filme (F-C16), sugerindo que elevados teores de fase lipídica interferem negativamente na estrutura da matriz polimérica. Contudo, quando empregado em concentrações reduzidas (1% e 2%), o ácido oleico permitiu a incorporação de até 2% de cada fármaco, sem formação visível de precipitado (F-C17 e F-C18), indicando uma interação favorável entre o IMQ e a TBF e com o meio lipofílico, sem comprometer as propriedades macroscópicas do filme.

Dessa forma, considerando os resultados obtidos, foram selecionadas para caracterização detalhada as formulações F-C17 e F-C18, que incorporaram maior quantidade de IMQ e TBF, contendo 779,2 µg/cm² de cada fármaco, mantendo, simultaneamente a integridade estrutural e as propriedades macroscópicas desejáveis para aplicação tópica.

5.5.1 Peso e espessura

Os filmes produzidos apresentaram superfície lisa, sem grumos, precipitados ou rachaduras, conforme mostrado na Figura 27. Os resultados referentes ao peso, à espessura e ao pH dos filmes contendo IMQ e TBF estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15. Caracterização dos filmes de quitosana obtidos pela técnica de evaporação de solvente contendo 779,2 µg/cm² de IMQ e TBF. Massa, espessura e pH dos filmes poliméricos (média ± DP, n = 3). IMQ – imiquimode e TBF – cloridrato de terbinafina; F-C17 – filme contendo imiquimode e cloridrato de terbinafina com 1% de ácido oleico; F-C18 – filme contendo imiquimode e cloridrato de terbinafina com 2% de ácido oleico.

Filme	Peso (g)	Espessura (mm)	pH
F-C17	0,152 ± 0,001	0,13 ± 0,01	5,4 ± 0,01
F-C18	0,161 ± 0,003	0,11 ± 0,01	5,8 ± 0,03
Branco F-C17	0,149±0,001	0,12±0,01	5,0±0,08
Branco FC-18	0,152±0,001	0,10±0,01	4,9±0,05

Quanto ao peso e à espessura, os resultados foram homogêneos em cada formulação, demonstrando boa reprodutibilidade do processo de preparo por casting e adequado controle da massa seca final. A uniformidade desses parâmetros é essencial para garantir consistência da dose por área e adequada performance mecânica e bioadesiva do filme (EL-KAMEL; ASHRI; ALSARRA, 2007; NAIR *et al.*, 2013). Uma variação muito grande nesse parâmetro poderia influenciar as propriedades físico-químicas e mecânicas do filme (VECCHI *et al.*, 2021). Observa-se que os filmes contendo 2% de ácido oleico apresentam valores de massa superiores aos de 1%, o que é esperado, uma vez que o ácido oleico é um componente não volátil e o aumento de sua concentração eleva a fração de sólidos do sistema. Os valores obtidos estão próximos da massa seca teórica estimada para cada formulação, indicando boa reprodutibilidade do processo de preparo.

Em relação à espessura, os valores ficaram entro da faixa considerada adequada para filmes poliméricos tópicos, entre 0,05 e 1,00 mm (NAIR *et al.*, 2013). Embora os filmes com 2% de ácido oleico apresentem maior massa, exibem espessuras ligeiramente menores, o que sugere uma matriz mais compacta e mais bem reorganizada. Esse comportamento pode ser atribuído à interação do ácido oleico com a matriz polimérica, favorecendo o espalhamento da solução durante o processo de *casting* e reduzindo a secagem irregular (AMARAL *et al.*, 2024; DONNELLY *et al.*, 2006; RAMINENI *et al.*, 2013).

Quanto ao pH, ele precisa ser compatível com o tolerado pela pele a fim de minimizar risco de irritação e preservar a integridade da barreira cutânea. Os filmes apresentaram valores de pH entre 4,9 e 5,8, faixa considerada adequada para aplicação tópica (GREENMAN, 1981). Adicionalmente, o pH da formulação pode influenciar o grau de ionização do IMQ e da TBF,

uma vez que ambos apresentam caráter levemente básico. Em pH levemente ácido, como na faixa de 5,0 a 5,8, estabelece-se um equilíbrio entre as formas ionizada e não ionizada dos fármacos. A fração não ionizada, por apresentar maior caráter lipofílico, tende a apresentar maior afinidade pelo EC, favorecendo sua partição na matriz lipídica da pele e contribuindo para a permeação cutânea. Por outro lado, a fração ionizada apresenta maior solubilidade na matriz aquosa do filme, o que pode auxiliar na manutenção da estabilidade e da dispersão do fármaco no sistema (ELMOWAFY, 2021; GRATIERI *et al.*, 2008).

5.5.2 Teor dos filmes

O conteúdo de IMQ e TBF manteve-se uniforme nas três formulações avaliadas, com resultados bem próximos da concentração do fármaco adicionada no filme, que foi de 779,2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Tabela 16). Embora os teores obtidos estejam próximos da concentração nominal adicionada (779,2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), observou-se variação entre os valores teóricos e experimentais, bem como maior coeficiente de variação para a TBF na formulação F-C18. Esse comportamento pode estar relacionado a presença de maior quantidade de ácido oleico, que pode favorecer interações entre os fármacos e os componentes da matriz, dificultando sua liberação total para o solvente extrator.

Tabela 16. Teor de IMQ e TBF nos filmes poliméricos. O teor foi determinado em amostras de área definida (1 cm^2) e expresso em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. O teor por filme foi estimado a partir do teor por área, considerando a área total de 3,85 cm^2 . Os resultados representam a média de três determinações independentes ($n = 3$). IMQ – imiquimode; TBF – cloridrato de terbinafina.

Fármacos	F-C17		F-C18	
	Teor ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	CV (%)	Teor ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	CV (%)
IMQ	900,3 $\pm$ 9,9	1,09	320,0 $\pm$ 2,1	5,1
TBF	661,8 $\pm$ 11,6	1,76	557,7 $\pm$ 5,8	6,8

Além disso, a natureza polimérica do sistema, associada ao processo de evaporação do solvente, pode promover aprisionamento parcial do fármaco na rede polimérica, influenciando a eficiência do processo extrativo. Essas interações podem dificultar a extração completa do fármaco da matriz polimérica para o solvente extrator (DONNELLY *et al.*, 2006; FREDERIKSEN; GUY; PETERSSON, 2015; LAYEK *et al.*, 2019). De modo geral, os coeficientes de variação permaneceram próximos a 5% indicando repetibilidade aceitável para formulações poliméricas experimentais contendo fase lipofílica.

5.5.3 Grau de intumescimento

O índice de intumescimento está diretamente relacionado ao desempenho bioadesivo do

filme, uma vez que a hidratação da matriz polimérica promove o relaxamento e a mobilidade das cadeias, favorecendo a interpenetração com o tecido biológico (NAIR *et al.*, 2013; KHAN *et al.*, 2016). Além disso, o grau de inchaço desses filmes é um parâmetro importante para o perfil de liberação do fármaco, pois influencia a difusão do ativo pela rede polimérica, podendo tanto facilitar sua liberação quanto promover retenção temporária na matriz (KHAN *et al.*, 2016).

Em água purificada, o F-C18 apresentou intumescimento acentuado já no primeiro minuto, atingindo valores superiores a 300%, enquanto o F-C17 apresentou aumento progressivo e mais controlado ao longo do tempo. Esse padrão indica que o aumento da fração lipofílica pode ter contribuído para maior reorganização estrutural da matriz, permitindo absorção mais rápida do meio.

A tabela 17 apresenta a evolução do ganho de massa em relação à massa inicial de cada filme ao longo do tempo. Observa-se que o filme F-C17 apresentou menor grau de intumescimento em comparação ao F-C18, tanto em água purificada quanto em tampão acetato pH 4,0. Esse comportamento sugere que a maior concentração de ácido oleico (F-C18) promoveu uma matriz mais permeável e hidratável, possivelmente por alterar a organização do sistema e as interações entre quitosana e PVA, resultando em maior absorção do meio em curto tempo.

Tabela 17. Intumescimento (%) dos filmes F-C17 (1% de ácido oleico) e F-C18 (2% de ácido oleico), contendo IMQ e TBF, em água purificada e tampão acetato de sódio pH 4,0 (média $\pm$ DP, n = 3). IMQ – imiquimode; TBF – cloridrato de terbinafina.

Grau de intumescimento (%) em água purificada					
Filmes	1 minuto	2 minutos	3 minutos	4 minutos	5 minutos
F-C17	88,42 $\pm$ 18,65	157,36 $\pm$ 10,10	175,78 $\pm$ 10,95	182,66 $\pm$ 16,15	195,47 $\pm$ 17,09
F-C18	331,36 $\pm$ 18,02	367,41 $\pm$ 3,16	361,10 $\pm$ 7,16	346,78 $\pm$ 3,39	339,99 $\pm$ 13,28
Grau de intumescimento (%) em tampão acetato de sódio pH 4,0					
	1 minuto	2 minutos	3 minutos	4 minutos	5 minutos
F-C17	124,02 $\pm$ 45,33	187,07 $\pm$ 18,51	197,43 $\pm$ 15,80	207,3 $\pm$ 21,99	215,44 $\pm$ 21,03
F-C18	215,92 $\pm$ 44,32	304,56 $\pm$ 55,72	193,13 $\pm$ 13,78	165,56 $\pm$ 9,62	146 $\pm$ 55,09

Em tampão acetato pH 4,0, condição relevante por corresponder ao meio do ensaio de liberação, ambos os filmes apresentaram grau de intumescimento elevado, porém, com comportamentos distintos. F-C17 mostrou aumento gradual e estável ao longo do tempo, sugerindo hidratação intensa com manutenção da integridade estrutural.

É importante destacar que, embora em água purificada o F-C18 apresente intumescimento elevado e relativamente estável ao longo dos 5 minutos avaliados (339,99% ao final), em tampão acetato pH 4,0 observa-se um padrão distinto, com pico de intumescimento em 2 minutos (304,56%), seguido de queda progressiva até 146% aos 5 minutos, sugerindo que o comportamento de erosão depende do meio de imersão e é potencializado em condições ácidas (LAYEK *et al.*, 2019; RAMINENI *et al.*, 2013). Em pH ácido, a protonação da quitosana aumenta a hidratação e pode favorecer a formação de uma fase gelificada. Entretanto, quando a matriz é menos coesa, como no filme F-C18, essa hidratação intensa pode acelerar a desintegração (EL-KAMEL; ASHRI; ALSARRA, 2007; NAIR *et al.*, 2013).

5.5.4 Propriedades mecânicas

A força de ruptura é medida pela resistência máxima do material no ponto de ruptura. De acordo com os resultados apresentados na Figura 28, os filmes brancos apresentaram ruptura clara, com pico de força máxima bem definida, indicando uma matriz mais rígida e frágil. Em contraste, os filmes contendo fármacos não romperam nas condições do ensaio, apresentando apenas deformação progressiva sob aplicação de força. Esse comportamento sugere aumento da flexibilidade e da tenacidade da matriz polimérica, possivelmente associado ao efeito plastificante dos fármacos e do ácido oleico, que aumentam a mobilidade das cadeias poliméricas. Resultados semelhantes são descritos para filmes contendo componentes lipofílicos ou ativos incorporados à matriz (DONNELLY *et al.*, 2006; RAMINENI *et al.*, 2013; TOLENTINO *et al.*, 2024).

As propriedades mecânicas dos filmes poliméricos são parâmetros fundamentais para sua aplicação tópica, pois influenciam diretamente a resistência ao manuseio, a integridade durante a aplicação e a capacidade de adaptação à superfície cutânea. O comportamento mecânico dos filmes foi avaliado por meio de ensaio de tração, considerando como parâmetros principais a força máxima e o alongamento máximo, amplamente utilizadas na caracterização comparativa de filmes poliméricos.

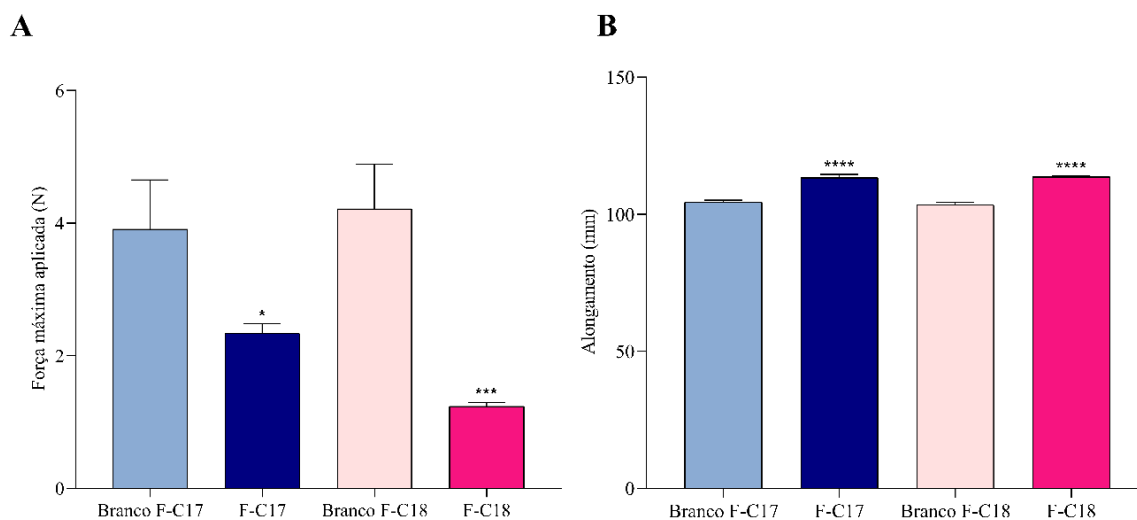


Figura 28. Representação gráfica dos resultados dos ensaios mecânicos para força máxima aplicada (A) e alongamento (B) dos filmes. Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n=3$). Análise estatística realizada por ANOVA seguida de teste de Tukey, sendo (*) $p \leq 0,05$, (**) $p \leq 0,001$ (****) $p \leq 0,0001$. Os filmes contendo os fármacos não apresentaram ruptura nas condições do ensaio, de modo que os valores apresentados em (A) correspondem à força máxima aplicada pelo equipamento. F-C17: filme contendo 1% de ácido oleico; F-C18: filme contendo 2% de ácido oleico. Fonte: Autoria própria.

Os filmes brancos apresentaram valores mais elevados de força máxima quando comparados aos filmes contendo fármacos. O Branco F-C17 apresentou força média de $3,91 \pm 0,61$ N, enquanto o filme branco F-C18 apresentou $4,21 \pm 0,55$ N, evidenciando maior resistência mecânica dessas matrizes na ausência de IMQ e TBF. Esse comportamento é consistente com a literatura, que descreve que matrizes poliméricas mais coesas, com maior densidade de interações poliméricas, tendem a apresentar maior resistência à tração, porém menor capacidade de deformação, caracterizando comportamento mais frágil e ruptura (EL-KAMEL; ASHRI; ALSARRA, 2007; LAYEK *et al.*, 2019).

Por outro lado, os filmes contendo fármacos apresentaram redução significativa da força máxima, com valores médios de $2,34 \pm 0,12$ N para o F-C17 e de $1,24 \pm 0,05$ N para o F-C18. Paralelamente, observou-se aumento do alongamento máximo, sendo que esses filmes não atingiram ruptura nas condições do ensaio. Esse conjunto de resultados indica uma transição no comportamento mecânico, de mais rígido e frágil (filmes brancos) para mais extensível (filmes com fármaco) (LIU *et al.*, 2013a).

A redução da resistência mecânica associada ao aumento da extensibilidade é um comportamento clássico de sistemas poliméricos, seja por meio da presença de plastificantes, água ou outros componentes capazes de aumentar a mobilidade das cadeias poliméricas. Nesse caso, além da glicerina, já reconhecida como plastificante eficaz para filmes hidrofílicos, a incorporação dos fármacos pode ter contribuído para a redução das interações poliméricas,

atuando como agentes de desorganização parcial da matriz, sem, contudo, comprometer a integridade estrutural do filme (ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009).

A comparação entre as formulações F-C17 (1% de ácido oleico) e F-C18 (2% de ácido oleico) evidencia um efeito da concentração do ácido oleico sobre o comportamento mecânico. Observa-se que o aumento da concentração de ácido oleico resultou em menor força máxima no filme F-C18, em comparação ao F-C17, concomitantemente com um discreto aumento do alongamento. Esse comportamento sugere que o ácido oleico, ao ser incorporado à matriz polimérica, pode interferir na continuidade da rede estrutural, reduzindo a coesão e promovendo maior flexibilidade do filme (DONNELLY *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2013a; RAMINENI *et al.*, 2013).

Assim, enquanto o F-C17 apresenta um equilíbrio mais próximo entre resistência mecânica e extensibilidade, o F-C18 tende a um comportamento mais macio e deformável, característica desejável para sistemas tópicos que necessitam de maior conformabilidade à superfície de aplicação, especialmente em lesões irregulares.

De modo geral, os resultados indicam que a incorporação de fármacos e o aumento da concentração de ácido oleico promovem modificações controladas no comportamento mecânico dos filmes, tornando-os menos frágeis e mais flexíveis. A ausência de ruptura nos filmes contendo fármacos reforça a adequação dessas formulações para uso tópico, uma vez que a maior capacidade de deformação reduz o risco de falhas mecânicas durante a aplicação e o uso clínico (GARCIA; PINOTTI; ZARITZKY, 2006; LIU *et al.*, 2013a).

5.5.5 Bioadesividade

A bioadesividade cutânea avalia o grau de interação e de adesão do filme polimérico à superfície da pele, sendo um parâmetro fundamental no desenvolvimento de sistemas tópicos destinados ao tratamento de lesões cutâneas, como as observadas na CBM. Esse parâmetro influencia diretamente o tempo de permanência da formulação no local de aplicação, favorecendo a liberação sustentada dos fármacos e potencializando sua ação terapêutica no tecido acometido.

No contexto da CBM, caracterizada por lesões verrucosas, hiperqueratóticas e de superfície irregular, a permanência prolongada da formulação no sítio infectado é essencial para promover a difusão adequada da TBF através do EC e para permitir que o IMQ exerça sua ação imunomoduladora nas camadas onde o fungo se estabelece (QUEIROZ *et al.*, 2017). Além disso, a adesão adequada reduz o risco de deslocamento do filme por à fricção mecânica,

sudorese ou movimentação corporal, fatores que podem comprometer a eficácia terapêutica e a adesão do paciente ao tratamento. (ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009).

Os valores de força de destacamento (Tabela 18) situaram-se na faixa de 0,19–0,20 N, tanto na condição seca quanto na condição umedecida, sem diferenças significativas entre as formulações ou entre as condições avaliadas. Esses resultados indicam que a incorporação dos fármacos e a variação na concentração de ácido oleico não comprometeram a capacidade adesiva da matriz polimérica. Os valores obtidos são comparáveis aos descritos na literatura para filmes bioadesivos à base de quitosana, que relataram forças de destacamento na faixa de 0,15-0,25 N (DONNELLY *et al.*, 2006; TOLENTINO *et al.*, 2024), além de serem compatíveis com a permanência sustentada da formulação no sítio de aplicação. A convergência entre os resultados obtidos e os dados da literatura reforça a adequação das formulações F-C17 e F-C18 em termos de capacidade adesiva para uso tópico indicando adesão suficiente para manutenção da formulação no sítio da lesão sem risco de adesão excessiva que pudesse dificultar a remoção ou causar dano tecidual (DONNELLY *et al.*, 2006; TOLENTINO *et al.*, 2024).

A força de destacamento reflete a intensidade das interações intermoleculares entre os polímeros da matriz (quitosana e PVA) e os componentes estruturais da pele, como queratina e proteínas epidérmicas. Além disso, a quitosana utilizada de médio peso molecular (190-310 kDa), apresenta comprimento de cadeia adequado para promover hidratação e mobilidade suficientes para formação de interações adesivas estáveis. Polímeros de maior peso molecular não se hidratam imediatamente, o que dificulta a interação com os tecidos, enquanto os polímeros de baixo peso molecular formam géis rapidamente e dissolvem-se com mais facilidade (SMART, 2005; ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009).

Tabela 18. Força máxima de bioadesão dos filmes poliméricos em condição seca e umedecida, expressa em Newton (N). Os valores representam a média $\pm$ DP (n = 3).

Filme	Força de bioadesão - seco (N)	Força de bioadesão - umedecido (N)
F-C17	0,196 $\pm$ 0,00	0,201 $\pm$ 0,00
F-C18	0,197 $\pm$ 0,00	0,197 $\pm$ 0,00
Branco F-C17	0,196 $\pm$ 0,00	0,201 $\pm$ 0,00
Branco FC-18	0,199 $\pm$ 0,00	0,199 $\pm$ 0,00

A análise conjunta dos resultados de intumescimento, propriedades mecânicas e bioadesividade evidencia que as formulações desenvolvidas apresentam um equilíbrio adequado entre absorção de água, flexibilidade e capacidade adesiva, características essenciais para filmes tópicos. O aumento da concentração de ácido oleico (F-C18) promoveu maior

alongamento e intumescimento, sem redução significativa da força de bioadesão. Já o F-C17 apresentou perfil mecânico mais equilibrado, com resistência superior e intumescimento moderado, mantendo força de adesão semelhante.

Assim, os filmes F-C17 e F-C18 demonstraram propriedades compatíveis com a aplicação tópica, apresentando adesão suficiente para manutenção no local da lesão, sem indicação de adesão excessiva que pudesse dificultar a remoção ou causar dano tecidual.

5.5.6 Morfologia

A morfologia dos filmes foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), por meio da análise da superfície e da seção transversal das amostras. Foram avaliados filmes com e sem IMQ e TBF. As imagens obtidas por MEV evidenciaram a presença de poros e cavidades na superfície dos filmes brancos, tanto na formulação contendo 1% quanto na contendo 2% de ácido oleico (Figura 29 e Figura 30). Essas estruturas podem estar associadas ao processo de evaporação do solvente durante a secagem, bem como à reorganização da matriz polimérica na ausência de fármacos.

Em contrapartida, os filmes contendo IMQ e TBF apresentaram superfície mais compacta, com redução aparente da porosidade. Esse comportamento pode ser atribuído ao efeito de preenchimento dos poros da matriz polimérica pelo IMQ, TBF e constituintes lipídicos, além de possíveis interações entre os fármacos, o polímero e o ácido oleico que promovem maior compactação da rede polimérica (Figura 31 e Figura 32). Essa reorganização estrutural pode resultar em matriz mais coesa e menos suscetível à formação de vazios superficiais.

A redução da porosidade observada nas formulações contendo fármacos pode influenciar no grau de hidratação, no comportamento mecânico e no perfil de liberação de IMQ e TBF, uma vez que a microestrutura da matriz está diretamente relacionada aos mecanismos de difusão e intumescimento do sistema polimérico.

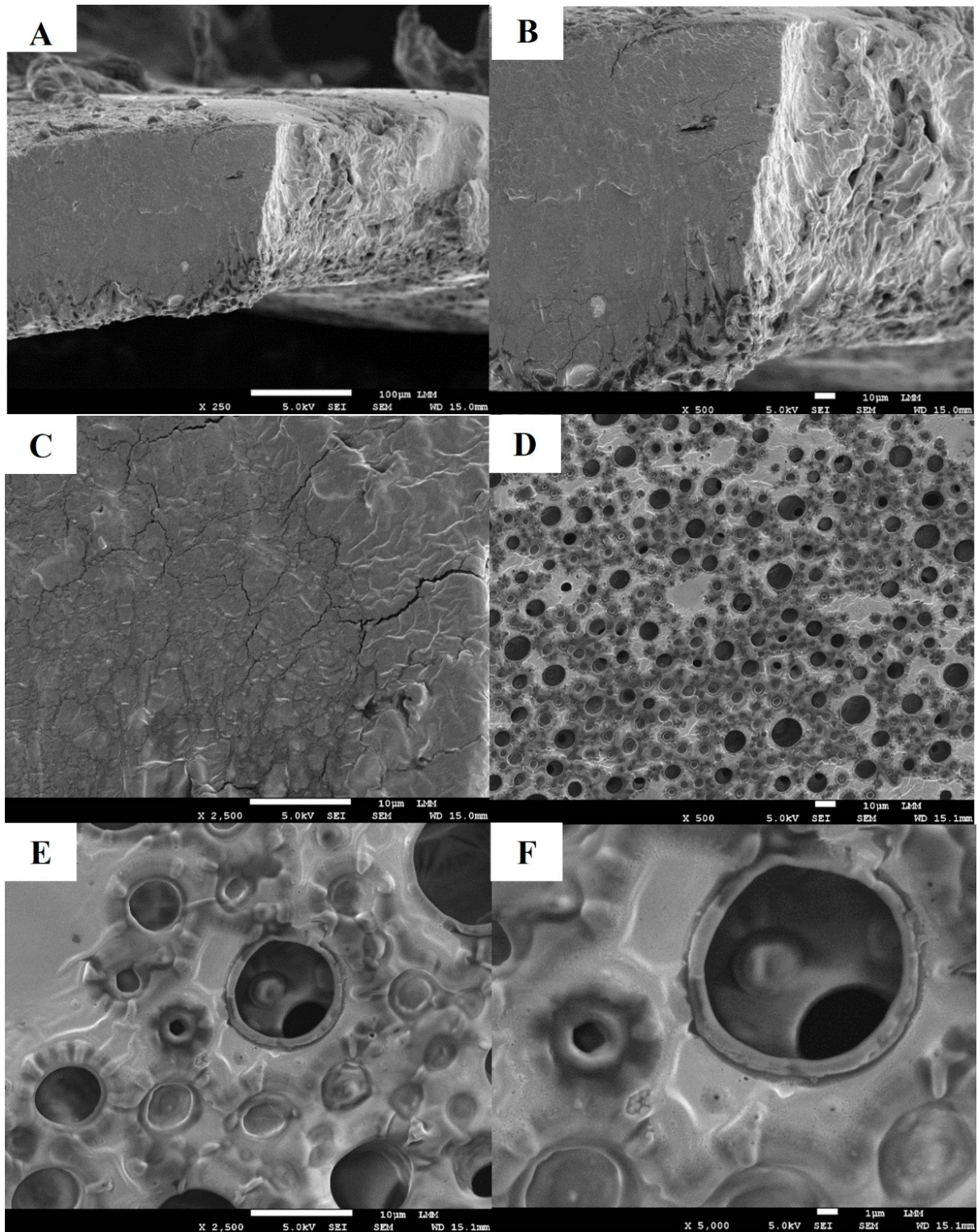


Figura 29. Microscopia eletrônica de varredura do filme polimérico branco contendo 1% de ácido oleico. (A) e (B) seção transversal, (C), (D) superfície do filme, (E) e (F) superfície do filme em maior ampliação. Fonte: Autoria própria.

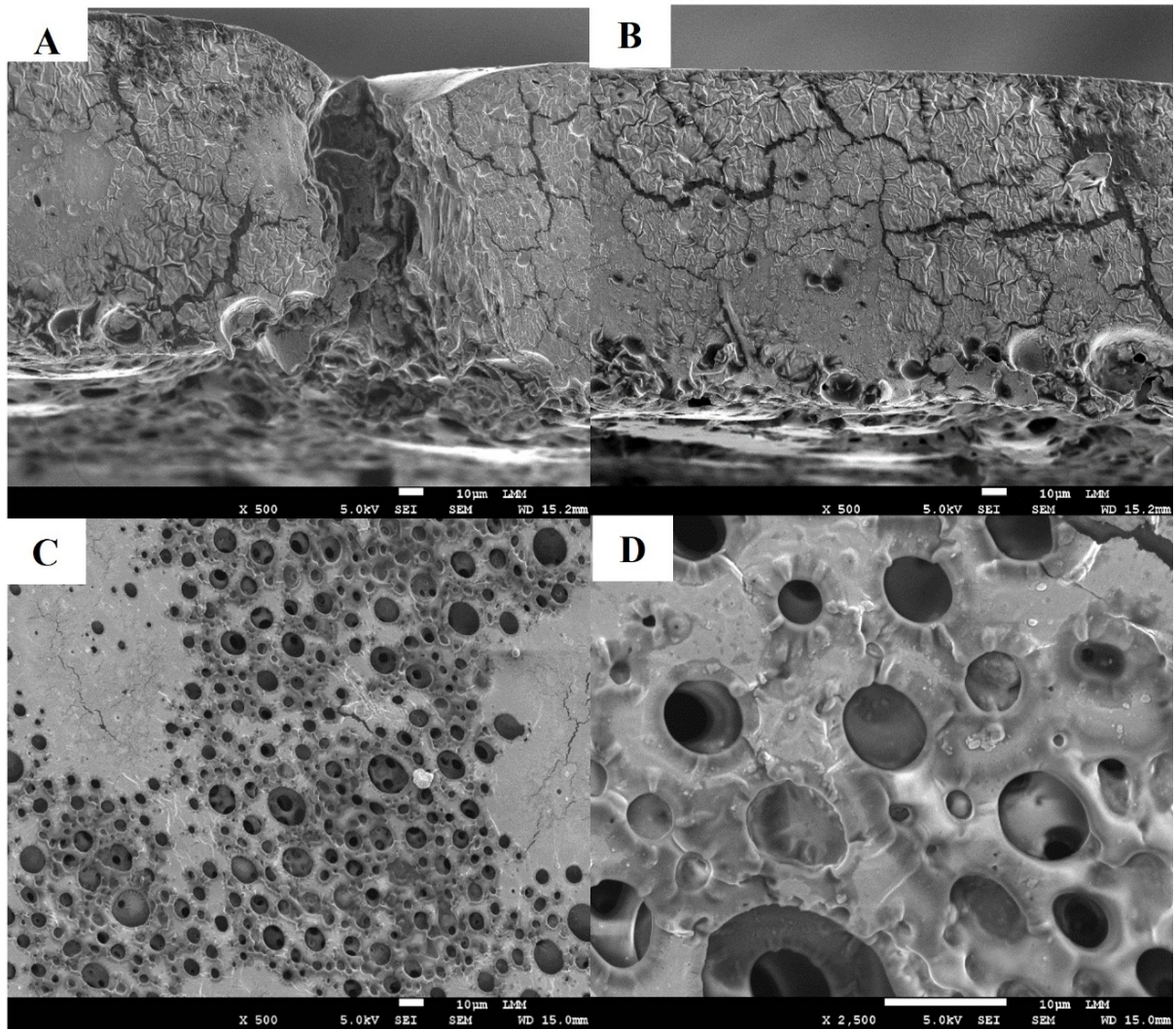


Figura 30. Microscopia eletrônica de varredura do filme polimérico branco contendo 2% de ácido oleico. (A) (B) seção transversal; (C) superfície do filme; (D) superfície do filme em maior ampliação. Fonte: Autoria própria.

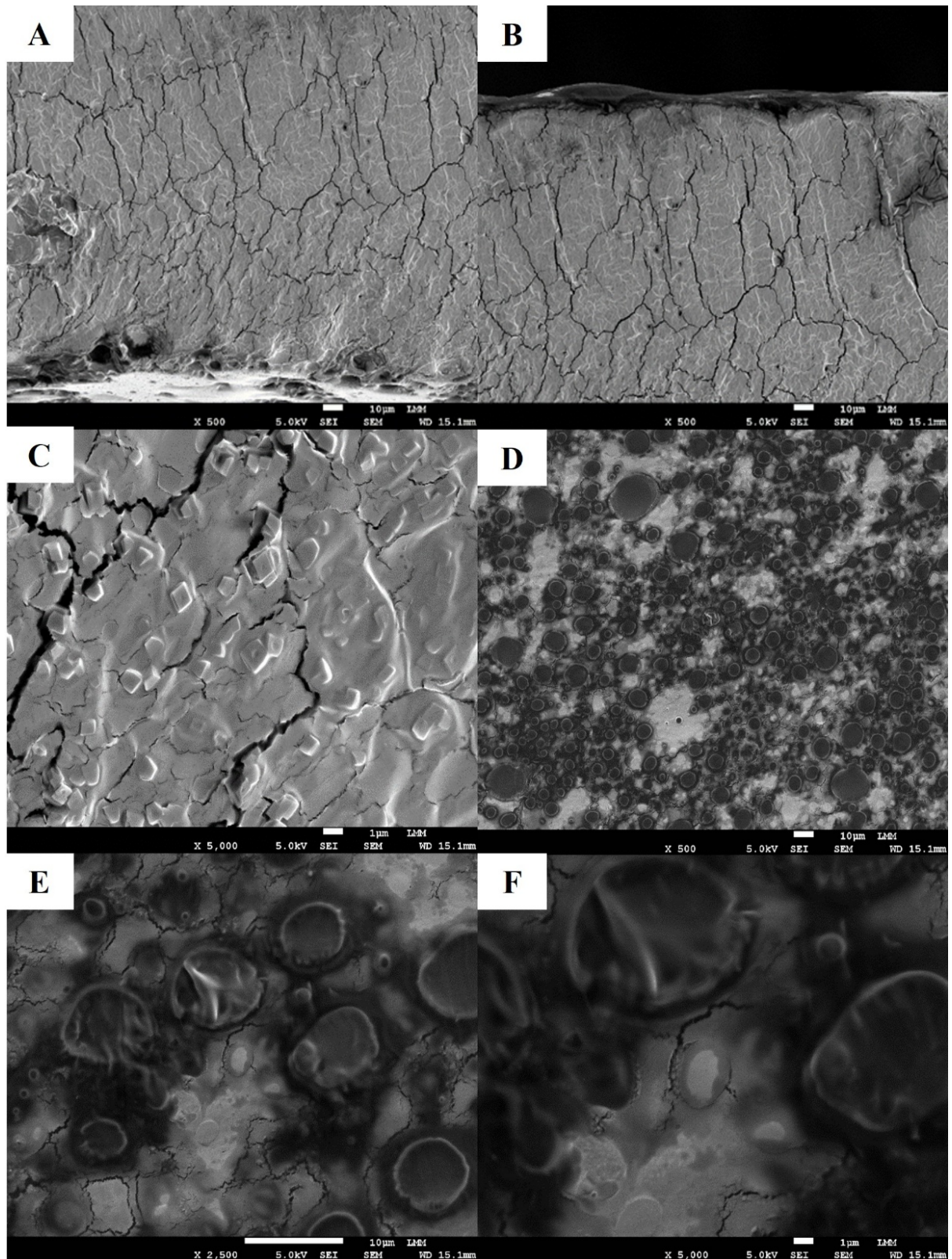


Figura 31. Microscopia eletrônica de varredura do filme polimérico contendo IMQ e TBF (F-C17). (A) (B) seção transversal, (C) superfície do filme, (D) superfície do filme em aumento de 2.500 x, (E) e (F) superfície do filme em maior ampliação. IMQ – imiquimode; TBF – cloridrato de terbinafina; F-C17 – filme contendo imiquimode e cloridrato de terbinafina com 1% de ácido oleico. Fonte: Autoria própria.

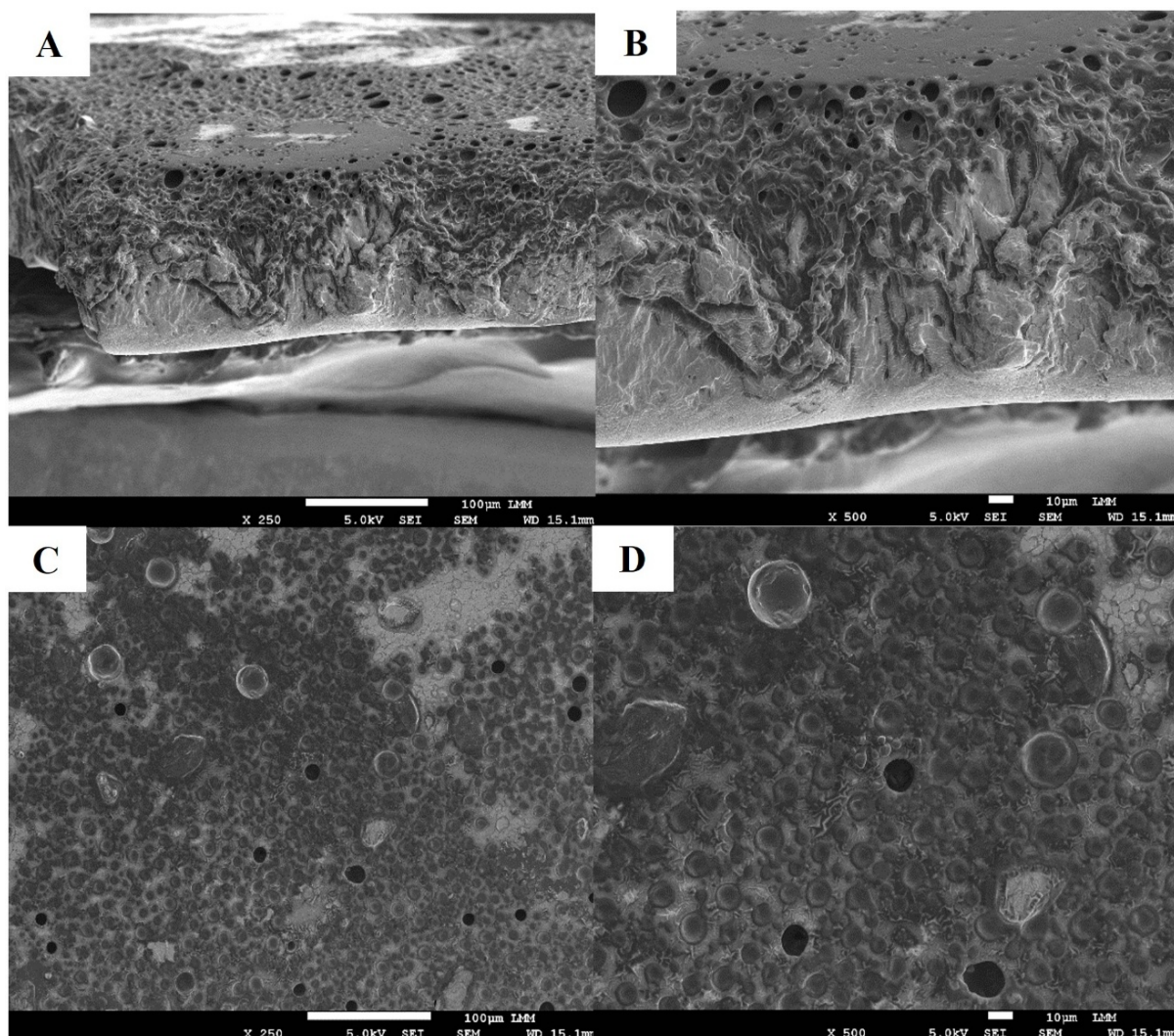


Figura 32. Microscopia eletrônica de varredura do filme polimérico contendo IMQ e TBF (F-C18). (A) (B) seção transversal, (C) superfície do filme, (D) superfície do filme em aumento de 500 x. IMQ – imiquimode; TBF – cloridrato de terbinafina; F-C18 – filme contendo imiquimode e cloridrato de terbinafina com 2% de ácido oleico. Fonte: Autoria própria.

5.6 ESTUDO DE ESTABILIDADE DE IMQ E TBF

Aspectos relacionados à formulação, como o processo de fabricação e as propriedades físico-químicas de seus componentes, influenciam a estabilidade de um filme polimérico, assim como fatores ambientais, incluindo temperatura e umidade (GIBSON, 2001).

Ao longo dos 30 dias de armazenamento, os filmes não apresentaram alterações macroscópicas perceptíveis, mantendo continuidade, homogeneidade e integridade estrutural. Não foram observadas fissuras, deformações ou precipitação de IMQ e TBF, indicando adequada compatibilidade entre a matriz polimérica e o ácido oleico, mesmo no filme F-C18, que apresenta maior teor lipofílico.

Os resultados referentes ao aspecto macroscópico estão apresentados na Figura 33, enquanto os valores de peso e espessura encontram-se na Tabela 19. Esses parâmetros foram

monitorados como indicadores indiretos de variação de umidade, reorganização estrutural ou possíveis alterações dimensionais da matriz polimérica.

Os valores de peso permaneceram estáveis em ambas as condições de armazenamento ($p > 0,05$), tanto sob refrigeração quanto em temperatura ambiente, indicando que o sistema não apresentou absorção significativa de umidade nem perda de componentes voláteis ao longo do período avaliado. Esse comportamento é particularmente relevante para sistemas poliméricos contendo plastificantes e fase lipofílica, nas quais poderia ocorrer, migração de componentes ou alterações na fração sólida do sistema.

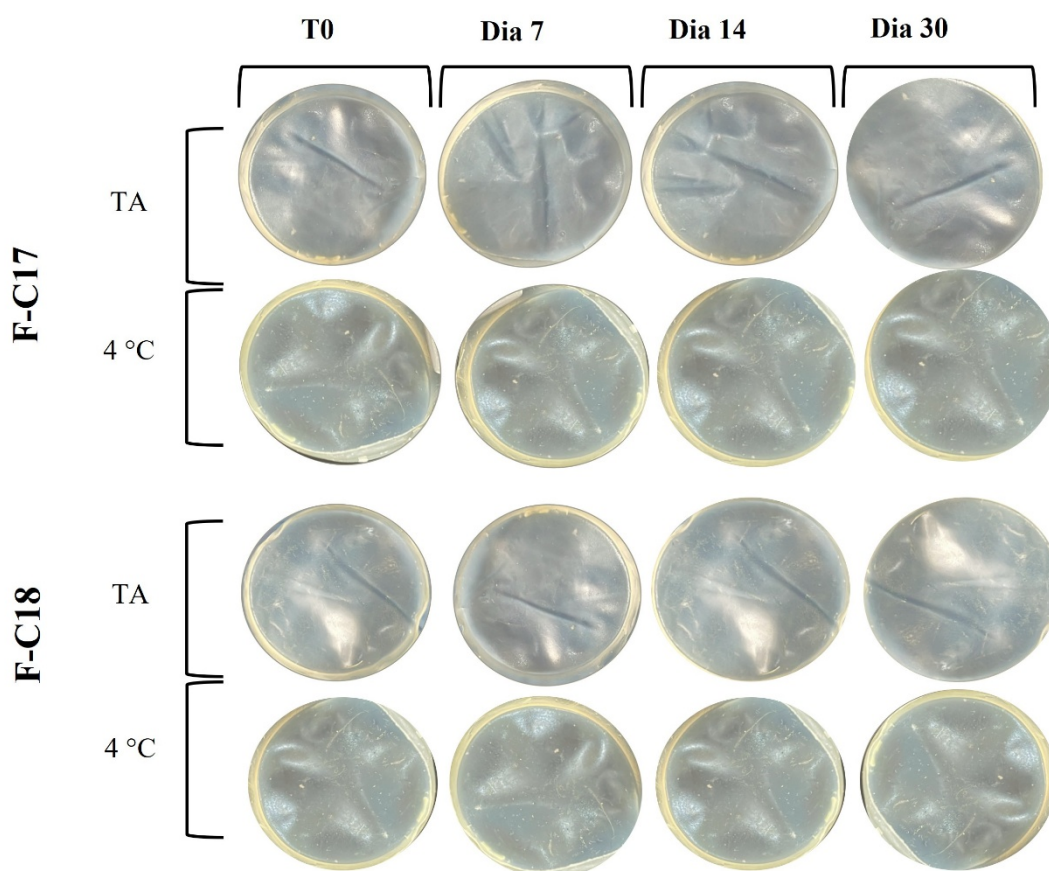


Figura 33. Avaliação macroscópica da estabilidade dos filmes F-C17 e F-C18 ao longo de 30 dias de armazenamento em temperatura ambiente e a 4 °C. As imagens correspondem aos dias 0, 7, 14 e 30 após o preparo. TA – Temperatura ambiente. Fonte: Autoria própria.

A espessura também se manteve constante, sem diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$), sugerindo ausência de retração estrutural ou relaxamento da rede polimérica durante o armazenamento. Essa estabilidade dimensional indica que o processo de secagem foi adequado.

Os resultados demonstram que os filmes F-C17 e F-C18 apresentam estabilidade física por pelo menos 30 dias nas condições avaliadas, mantendo as suas características macroscópicas.

Tabela 19. Avaliação da estabilidade física dos filmes F-C17 e F-C18 ao longo de 30 dias de armazenamento em 4 °C e temperatura ambiente. Valores de peso (g) e espessura (mm) expressos como média $\pm$ desvio padrão (n = 3). F-C17 – filme contendo IMQ e TBF com 1% de ácido oleico; F-C18 - filme contendo IMQ e TBF com 2% de ácido oleico.

Peso (g)								
F-C17					F-C18			
Condição	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 30	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 30
4 °C	0,151 $\pm$ 0,001	0,151 $\pm$ 0,001	0,151 $\pm$ 0,001	0,151 $\pm$ 0,001	0,160 $\pm$ 0,003	0,160 $\pm$ 0,002	0,160 $\pm$ 0,003	0,160 $\pm$ 0,002
Temperatura ambiente	0,152 $\pm$ 0,001	0,152 $\pm$ 0,001	0,152 $\pm$ 0,001	0,152 $\pm$ 0,002	0,161 $\pm$ 0,001	0,161 $\pm$ 0,003	0,161 $\pm$ 0,003	0,161 $\pm$ 0,002

Espessura (mm)								
F-C17					F-C18			
Condição	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 30	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 30
4 °C	0,13 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,02	0,13 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,02	0,12 $\pm$ 0,01
Temperatura ambiente	0,13 $\pm$ 0,02	0,13 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,02	0,11 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,02	0,11 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,02

5.7 ESTUDOS *IN VITRO* DE LIBERAÇÃO DE IMQ E TBF A PARTIR DOS FILMES

O estudo de liberação foi realizado *in vitro* e teve como objetivo avaliar a velocidade de liberação de IMQ e TBF dos filmes F-C17 e F-C18, em comparação com um controle dos fármacos livres. Os resultados estão apresentados na Figura 34.

A suspensão controle apresentou liberação mais rápida e maior porcentagem liberada ao longo de 12 horas, comportamento esperado para sistemas sem mecanismo de controle de liberação. Já os filmes poliméricos promoveram uma liberação mais lenta e sustentada, evidenciando o papel da matriz polimérica como moduladora da difusão dos fármacos.

Para o IMQ, mais de 60% do fármaco foi liberado a partir do controle após 12 horas. Quando incorporado aos filmes, observou-se redução significativa da fração liberada ($p \leq 0,0001$), com aproximadamente 30% liberado pelo F-C17 e 15% pelo F-C18 no mesmo período. O aumento da concentração de ácido oleico resultou, portanto, em maior retenção do fármaco na matriz. Esse comportamento pode ser explicado pelo caráter lipofílico do fármaco nos domínios lipídicos formados pelo ácido oleico, o que dificulta sua difusão para o meio receptor (DONNELLY *et al.*, 2006; RAMINENI *et al.*, 2013).

A TBF apresentou perfil ainda mais restrito. Enquanto aproximadamente 21% do fármaco foi liberado a partir do controle após 12 horas, os filmes promoveram liberação significativamente inferior ($p \leq 0,0001$), com cerca de 5% liberado pelo F-C17 e 2% pelo F-C18. Considerando o elevado log P da TBF, a maior retenção na formulação contendo 2% de ácido oleico reforça a influência da fase lipofílica na modulação do perfil de liberação (LAYEK *et al.*, 2019; TUNCAY TANRIVERDI *et al.*, 2015).

Esses resultados indicam que o aumento da concentração de ácido oleico favorece maior interação entre o IMQ e TBF e a fase lipídica, reduzindo a taxa de difusão através da matriz hidratada e resultando em perfil de liberação mais sustentado.

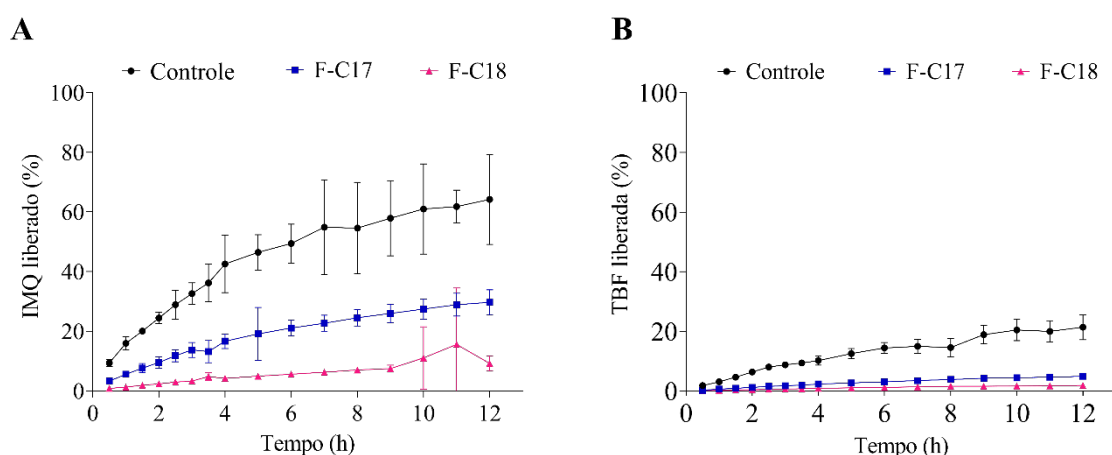


Figura 34. Perfil de liberação do IMQ (A) e de TBF (B) a partir dos filmes F-C17, F-C18 ou controle contendo os fármacos livres em suspensão, na mesma concentração (2% de IMQ e TBF) no período de 12 h. Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n=5$). IMQ - imiquimode; TBF - cloridrato de terbinafina; F-C17: filme contendo imiquimode e cloridrato de terbinafina com 1% de ácido oleico; F-C18: filme contendo imiquimode e cloridrato de terbinafina com 2% de ácido oleico. Fonte: Autoria própria.

Em relação à cinética de liberação, os valores de regressão linear (r^2) obtidos para a aplicação dos modelos matemáticos em cada um dos perfis de liberação estão apresentados na Tabela 20. Para F-C17, tanto para IMQ quanto para TBF, o modelo de Higuchi apresentou os maiores coeficientes de correlação ($r^2 = 0,9947$ e $0,9964$, respectivamente), indicando que o mecanismo predominante de liberação é controlado por difusão a partir de uma matriz polimérica hidratada. Esse resultado é coerente com o perfil de intumescimento gradual e progressivo observado para essa formulação, no qual a absorção controlada do meio favorece a difusão contínua dos fármacos através da rede polimérica ao longo do tempo.

Para o F-C18, o comportamento variou conforme o fármaco. Para o IMQ, os modelos de ordem zero e Hixson-Crowell apresentaram ajustes elevados ($r^2 = 0,96$), o que é compatível com o perfil de liberação observado, com taxa de liberação constante ao longo das 12 horas, sugerindo que a matriz atua como uma barreira de difusão estável, sem aceleração progressiva. Já para a TBF, o modelo de Weibull apresentou elevado coeficiente de correlação ($r^2 = 0,99$),

indicando comportamento compatível com sistemas complexos nos quais a liberação envolve combinação de difusão e relaxamento da matriz. Esses resultados são consistentes com o intumescimento elevado e rápido seguido de redução observado para o F-C18 em tampão acetato pH 4,0, padrão sugestivo de hidratação intensa inicial com possível início de erosão superficial da rede polimérica, o que pode contribuir para a retenção prolongada dos fármacos na matriz.

De modo geral, os resultados sugerem que o mecanismo predominante de liberação nos filmes é difusional, com contribuição do intumescimento da matriz e da partição dos fármacos nos domínios lipídicos formados pelo ácido oleico.

O aumento da concentração de ácido oleico no F-C18 intensificou a retenção dos ativos, particularmente dos compostos mais lipofílicos, promovendo um perfil de liberação mais sustentado em comparação ao F-C17. Esse comportamento pode ser atribuído à maior partição dos fármacos nos domínios lipídicos formados pelo ácido oleico, que reduz a taxa de difusão para o meio receptor (PAPADOPOULOU *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2013a).

Tabela 20. Valores de regressão linear (r^2) obtidos pela aplicação dos perfis de liberação nos modelos de ordem zero, Higuchi, primeira ordem, Weibull e Hixson Crowell.

Filme	Fármacos	Regressão linear (r^2)				
		Ordem zero	Higuchi	Primeira ordem	Weibull	Hixson-Crowell
F-C17	IMQ	0,9569	0,9947	0,7917	0,9178	0,9791
	TBF	0,9794	0,9964	0,7745	0,8778	0,9892
F-C18	IMQ	0,9627	0,8101	0,8539	0,6611	0,9636
	TBF	0,9918	0,7908	0,9163	0,9908	0,9908

5.8 ENSAIOS *IN VITRO* DE PERMEACÃO CUTÂNEA

Os ensaios foram conduzidos com o objetivo de avaliar a penetração cutânea do IMQ e da TBF a partir dos filmes F-C17 e F-C18, em comparação com a suspensão controle contendo os fármacos livres. Após 12 horas de experimento, as amostras de pele foram submetidas ao procedimento de *tape stripping* para separação do EC, seguido da análise da PR, permitindo diferenciar a fração retida na camada mais superficial das camadas mais profundas.

Na Figura 35 estão demonstrados os dados referentes à distribuição do fármaco nas camadas da pele.

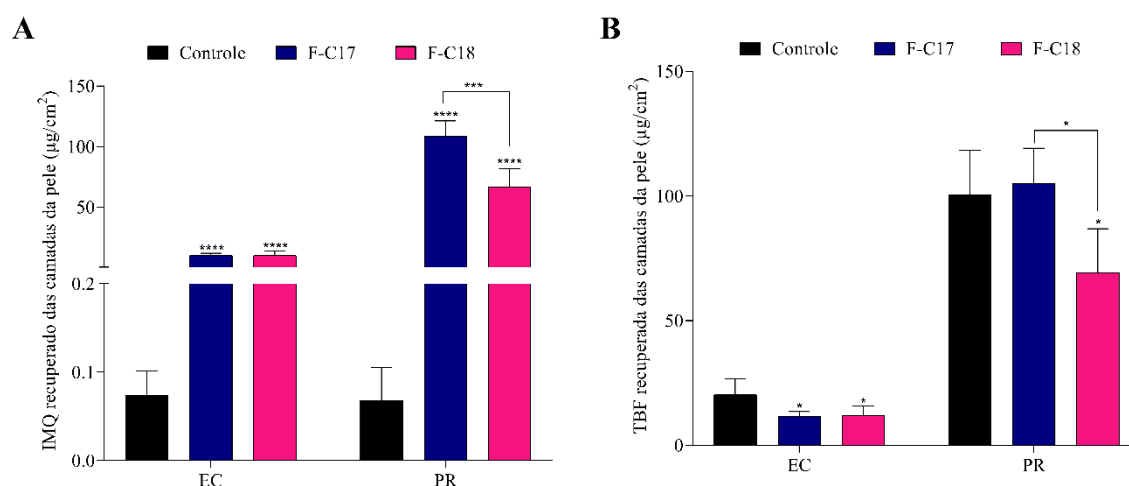


Figura 35. Quantificação de IMQ (A) e de TBF (B) recuperados das camadas da pele (estrato córneo – EC e pele remanescente – PR) após 12 horas de ensaio *in vitro* de penetração cutânea, a partir dos filmes F-C17, F-C18 ou controle contendo os fármacos livres em suspensão, na mesma concentração (2% de IMQ e TBF). Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=5). Análise estatística por ANOVA, seguida do teste de Tukey, sendo (*)= $p \leq 0,05$; (***)= $p \leq 0,001$; (****)= $p \leq 0,0001$. IMQ - imiquimode; TBF - cloridrato de terbinafina; F-C17: filme contendo imiquimode e cloridrato de terbinafina com 1% de ácido oleico; F-C18: filme contendo imiquimode e cloridrato de terbinafina com 2% de ácido oleico. Fonte: Autoria própria.

Após 12 horas de experimento, foram observadas diferenças estatisticamente significativas na quantidade de IMQ e TBF recuperadas no EC entre as formulações F-C17, F-C18 e a suspensão controle. Para o IMQ, foram quantificados $10,02 \pm 1,84 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ no filme F-C17 e $10,4 \pm 3,54 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ no filme F-C18, valores significativamente superiores ao controle ($p < 0,0001$), não havendo diferença estatística entre as formulações. De forma semelhante, para a TBF, os valores observados para F-C17 foi de $11,57 \pm 1,97 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e para F-C18 de $11,95 \pm 3,73 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, também superiores ao controle ($p < 0,05$), sem diferença significativa entre os filmes. Esse resultado indica que a incorporação dos fármacos à matriz polimérica não comprometeu a deposição inicial nessa camada, uma vez que o EC atua como principal reservatório cutâneo de fármacos lipofílicos, favorecendo sua posterior difusão para camadas mais profundas (MOSER, 2001; TAVARES LUIZ *et al.*, 2021).

Foi observado na PR que o filme F-C17 promoveu maior deposição de IMQ ($104,82 \pm 14,75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) em comparação ao F-C18 ($66,38 \pm 15,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) ($p < 0,001$). Para a TBF, verificou-se comportamento semelhante, com maior deposição para o F-C17 ($105,12 \pm 20,51 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), enquanto o F-C18 apresentou valores significativamente inferiores ($69,32 \pm 20,00 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) diferindo estatisticamente tanto do F-C17 quanto do controle ($p < 0,05$). Adicionalmente, a quantificação de IMQ e TBF no meio receptor também ficou abaixo do limite de quantificação em todas as amostras. Isso indica que a permeação do fármaco através da pele é restrita, o que é desejável para um tratamento tópico, uma vez que minimiza a

exposição sistêmica do fármaco. Em conjunto, esses resultados demonstram que o aumento da concentração de ácido oleico na formulação impactou diretamente a fração de fármaco disponível para penetração nas camadas viáveis da pele. Embora o ácido oleico seja reconhecido como promotor de permeação por sua capacidade de interagir com os lipídios intercelulares do EC, seu aumento na formulação também pode intensificar a partição dos fármacos nos domínios lipídicos. Assim, no F-C18, o IMQ e a TBF podem permanecer mais fortemente associada à fase lipofílica da matriz, resultando em menor quantidade transferida para a PR (KIM *et al.*, 2023).

Considerando os resultados do ensaio de liberação *in vitro*, em que o F-C18 apresentou perfil mais controlado, especialmente para a TBF, observa-se que a maior retenção do fármaco na matriz se traduz em menor deposição na PR. A maior deposição promovida pelo F-C17 na PR é particularmente relevante para o tratamento da CBM, uma vez que o agente etiológico se estabelece predominantemente nessas regiões (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017). Portanto a retenção nessa camada pode favorecer concentrações locais eficazes de TBF e ao mesmo tempo permitir a ação imunomoduladora sustentada do IMQ.

Estudos indicam que concentrações relativamente baixas de IMQ (0,1–0,5 µg/mL) capazes de induzir produção de citocinas pró-inflamatórias e ativação da resposta imune inata, enquanto concentrações mais elevadas estão associadas a efeitos pró-apoptóticos diretos em células alvo (TELÒ *et al.*, 2016). Nesse contexto, a deposição significativa de IMQ observada na PR nos ensaios de penetração cutânea sugere que os filmes desenvolvidos podem atingir concentrações suficientes para estimular a resposta imune local, contribuindo para o controle da infecção fúngica.

Além disso, os resultados obtidos nos ensaios de penetração cutânea indicam que os filmes desenvolvidos promoveram deposição significativa de TBF na PR. As quantidades recuperadas nos filmes F-C17 e F-C18 são superiores ao MIC de $\leq 0,5$ µg/mL descrito para *F. pedrosoi*, sugerindo que os filmes podem atingir concentrações terapêuticas adequadas no local da infecção. Nesse contexto, as quantidades de TBF recuperadas na PR nos filmes F-C17 (105,1 µg/cm²) e F-C18 (69,3 µg/cm²) superam em larga margem os valores de MIC descritos, indicando que a formulação pode atingir concentrações terapeuticamente eficazes no sítio de infecção (DA SILVA HELLWIG *et al.*, 2019; SMITH *et al.*, 2025).

A oclusividade proporcionada pelos filmes pode contribuir para a hidratação do EC, promovendo reorganização dos corneócitos e das lamelas lipídicas intercelulares, o que pode favorecer a penetração controlada dos fármacos. Em comparação com formulações

semissólidas convencionais, os filmes apresentam a vantagem de prolongar o tempo de residência no local de aplicação, possibilitando intervalos de dosagem mais espaçados e maior adesão terapêutica (KIM et al., 2023).

Dessa forma, a liberação sustentada promovida pela matriz polimérica pode contribuir para manter níveis terapêuticos de ambos os fármacos no tecido ao longo do tempo, favorecendo a ação antifúngica local da TBF e a estimulação da resposta imune induzida pelo IMQ. Esse perfil farmacotécnico pode representar uma estratégia promissora para otimizar o tratamento tópico da CBM, potencializando a eficácia terapêutica e reduzindo a necessidade de terapias sistêmicas prolongadas.

5.9 AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DOS FILMES

O ensaio HET-CAM foi utilizado para avaliar o potencial irritativo dos filmes na pele. Inicialmente relatado por Luepke (LUEPKE, 1985), esse ensaio é capaz de analisar o efeito vascular de formulações destinadas para uso tópico. Os resultados da avaliação do potencial irritativo dos filmes são apresentados na Figura 36.

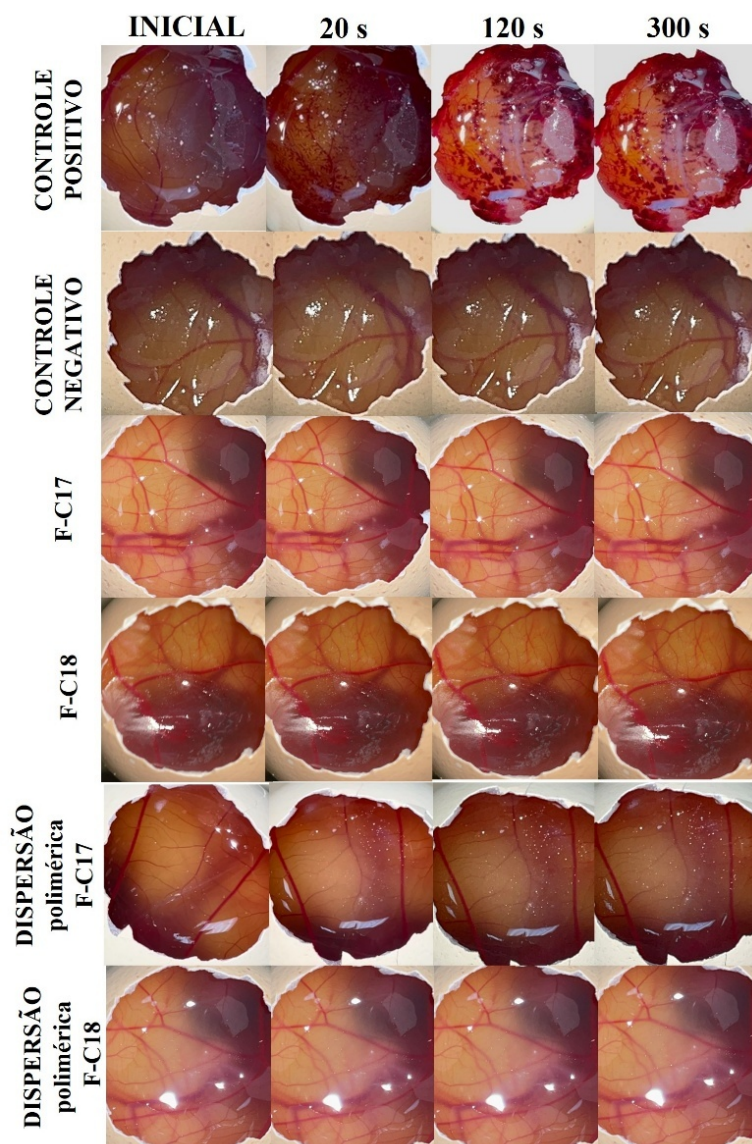


Figura 36. Avaliação do potencial irritativo pelo ensaio HET-CAM (Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane). As imagens apresentam os resultados obtidos para o controle positivo, controle negativo, filmes F-C17 e F-C18 aplicados diretamente sobre a membrana, bem como para as respectivas soluções das formulações. As imagens foram registradas após a aplicação das amostras na membrana cório-alantóide dos ovos embrionados, nos tempos de 30, 120 e 300 segundos. Fonte: Autoria própria.

As imagens apresentadas na Figura 36 foram capturadas no momento anterior à aplicação da formulação e 30, 120 e 300 segundos após o fim da exposição à formulação. Durante esse período, com o uso do controle positivo (NaOH 0,1 mol/L), foram observadas alterações, como visualização de capilares que não eram visíveis anteriormente ou dilatação dos vasos já visíveis (hiperemia), vazamento difuso de sangue dos vasos e capilares (hemorragia), interrupção do fluxo sanguíneo nos vasos (coagulação) e opacidade total ou parcial da membrana (opacidade) (PALMEIRA-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2018).

Com a aplicação do controle negativo (solução salina a 0,9%), nenhum desses fenômenos foi observado durante o período do teste. As amostras F-17 e F-C18 apresentaram efeito bem semelhante ao observado no controle negativo, sem que se registrasse nenhum desses eventos vasculares durante o período de realização do ensaio.

O índice de irritabilidade das amostras e dos controles foi calculado, e os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão dos valores obtidos nos três ovos analisados para cada formulação, conforme apresentado na Tabela 21.

Tabela 21. Índice de irritabilidade calculado após a aplicação do teste de HET-CAM para controle positivo, controle negativo, filmes (F-C17 e F-C18) e dispersão filmogênica, e sua respectiva classificação. Resultados representados com média ($n=3$) $\pm$ DP.

Amostras	Índice de irritabilidade	Classificação
Controle positivo	$19,0 \pm 0,2$	Irritante Severo (IS)
Controle negativo	$0,0 \pm 0,0$	Não irritante (NI)
F-C17	$0,0 \pm 0,0$	Não irritante (NI)
F-C18	$0,0 \pm 0,0$	Não irritante (NI)
Dispersão líquida do filme F-C17	$0,0 \pm 0,0$	Não irritante (NI)
Dispersão líquida do filme F-C18	$0,0 \pm 0,0$	Não irritante (NI)

Os resultados demonstraram que o índice de irritabilidade calculado para o controle positivo foi de $19,0 \pm 0,2$, enquanto os valores obtidos para o controle negativo e para as formulações (F-C17, F-C18 e as dispersões líquidas dos filmes F-C17 e F-C18) foram iguais a zero. Dessa forma, o controle positivo foi classificado como irritante severo, enquanto o controle negativo e as formulações foram classificados como não irritantes. Esses resultados sugerem que as formulações apresentam baixo potencial irritativo, o que é particularmente relevante para esse tipo de sistema, considerando que o filme permanecerá aderido à pele por períodos prolongados e em contato com tecidos adjacentes saudáveis.

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu avançar no desenvolvimento de uma abordagem terapêutica inovadora para o tratamento da CBM, baseada em filmes poliméricos de quitosana contendo IMQ e TBF. Ao longo deste estudo, foi possível demonstrar não apenas a viabilidade tecnológica da formulação, mas também a robustez metodológica necessária para sua adequada caracterização. A metodologia analítica por CLAE-FL, desenvolvida e validada, apresentou elevada sensibilidade, seletividade e reprodutibilidade, permitindo a quantificação confiável de ambos os fármacos em matrizes complexas, como pele e formulações poliméricas, o que representa um avanço importante para futuros estudos biofarmacêuticos envolvendo esse sistema.

As análises de compatibilidade química indicaram ausência de interações significativas entre os fármacos e os excipientes utilizados, confirmando a estabilidade da associação IMQ–TBF na matriz polimérica de quitosana e assegurando a integridade dos ativos durante o processo de desenvolvimento. Entre as formulações avaliadas, os filmes F-C17 e F-C18 destacaram-se por apresentarem propriedades mecânicas adequadas, boa capacidade bioadesiva e estabilidade físico-química ao longo do período de armazenamento avaliado. Contudo, o sistema F-C17 demonstrou desempenho biofarmacêutico superior, exibindo um perfil de liberação sustentado e maior penetração cutânea de ambos os fármacos nas camadas viáveis da pele. Esse comportamento pode ser atribuído à concentração otimizada de ácido oleico utilizada na formulação, que atua como promotor de permeação e favorece o transporte dos ativos através da barreira cutânea.

Adicionalmente, a segurança preliminar para aplicação tópica foi confirmada por meio do ensaio HET-CAM, no qual todas as formulações foram classificadas como não irritantes, indicando boa biocompatibilidade do sistema desenvolvido. Esses resultados reforçam o potencial dos filmes poliméricos como uma plataforma promissora para a administração tópica combinada de agentes antifúngicos e imunomoduladores, estratégia particularmente relevante no contexto da CBM, uma micose negligenciada que ainda apresenta importantes limitações terapêuticas.

De forma integrada, os resultados obtidos demonstram que o sistema desenvolvido constitui uma alternativa tecnológica promissora ao tratamento convencional da CBM. A estratégia de liberação prolongada proposta mostrou-se capaz de favorecer a deposição cutânea dos ativos, potencialmente reduzindo a necessidade de doses sistêmicas elevadas e,

consequentemente, minimizando efeitos adversos e melhorando a adesão terapêutica dos pacientes.

Embora os achados obtidos sejam bastante importantes, o avanço desta proposta terapêutica depende da continuidade das pesquisas. Nesse sentido, os próximos passos do estudo deverão concentrar-se na avaliação da atividade antifúngica e imunomoduladora do sistema em modelos biológicos mais complexos. Ensaios *in vitro* frente a isolados clínicos de *Fonsecaea pedrosoi* serão fundamentais para confirmar a eficácia antifúngica do sistema, bem como para investigar possíveis efeitos sinérgicos entre a TBF e o IMQ. Além disso, estudos *in vivo* em modelos experimentais de CBM permitirão avaliar, de forma mais abrangente, o desempenho terapêutico dos filmes, incluindo a resposta imunológica local, a redução da carga fúngica e a evolução das lesões cutâneas.

Essas etapas subsequentes serão conduzidas em colaboração com o grupo de pesquisa da Prof.^a Dr.^a Larissa Fernandes, cuja expertise na área de micologia médica e modelos experimentais de CBM foi fundamental para a concepção da proposta terapêutica aqui investigada. A continuidade dessa colaboração deverá contribuir significativamente para consolidar a aplicabilidade clínica do sistema desenvolvido.

Assim, este estudo não apenas estabelece as bases tecnológicas para uma nova estratégia terapêutica tópica para a CBM, mas também abre perspectivas relevantes para o desenvolvimento de sistemas de liberação cutânea capazes de integrar antifúngicos e moduladores da resposta imune. Considerando a escassez de terapias eficazes para essa micose negligenciada, os resultados apresentados reforçam a relevância científica e translacional da abordagem proposta, indicando um caminho promissor para futuras investigações e, potencialmente, para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas direcionadas ao tratamento da CBM.

REFERÊNCIAS

- ALGAHTANI, Mohammed S. et al. Co-delivery of imiquimod and curcumin by nanoemugel for improved topical delivery and reduced psoriasis-like skin lesions. **Biomolecules**, v. 10, n. 7, p. 968, 2020.
- ALVAREZ-FIGUEROA, María Javiera et al. Design of Chitosan Nanocapsules with Compritol 888 ATO® for Imiquimod Transdermal Administration. Evaluation of Their Skin Absorption by Raman Microscopy: Alvarez-Figueroa et al. **Pharmaceutical Research**, v. 37, n. 10, p. 195, 2020.
- AMARAL, Venâncio A. et al. Chitosan membranes incorporating Aloe vera glycolic extract with joint synthesis of silver nanoparticles for the treatment of skin lesions. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 15, n. 4, p. 1376-1392, 2025.
- AMEEN, M. Chromoblastomycosis: clinical presentation and management. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 34, n. 8, p. 849–854, dez. 2009.
- ANDREWS, G. P.; LAVERTY, T. P.; JONES, D. S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2009.
- ANVISA. **RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017**. Brasil: 2017
- ARAFAT, M. G. *et al.* Propolis-based niosomes as oromuco-adhesive films: A randomized clinical trial of a therapeutic drug delivery platform for the treatment of oral recurrent aphthous ulcers. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, 2018.
- ARANAZ, Inmaculada et al. Functional characterization of chitin and chitosan. **Current chemical biology**, v. 3, n. 2, p. 203-230, 2009.
- ARGENZIANO, Monica et al. *In vitro* enhanced skin permeation and retention of imiquimod loaded in β -cyclodextrin nanosponge hydrogel. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 3, p. 138, 2019.
- AYCAN, D.; YAYLA, N. A.; AYDIN, Y. A. Chitosan polyvinyl alcohol blend films for ibuprofen encapsulation: Fabrication, characterization and kinetics. **Polymer Degradation and Stability**, v. 181, 1 nov. 2020.
- BAJWA, Maryam et al. Thermo-responsive sol-gel-based nano-carriers containing terbinafine HCl: formulation, in vitro and ex vivo characterization, and antifungal activity. **Gels**, v. 9, n. 10, p. 830, 2023.
- BARONI, A. *et al.* Structure and function of the epidermis related to barrier properties. **Clinics in Dermatology**, v. 30, n. 3, p. 257–262, 2012.
- BASKAR, D.; SAMPATH KUMAR, T. S. Effect of deacetylation time on the preparation, properties and swelling behavior of chitosan films. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 4, p. 767–772, 2009.
- BANNWARTH, C. et al. Extended tight-binding quantum chemistry methods. **WIREs Computational Molecular Science**, v. 11, n. 2, 9 ago. 2020.
- BANNWARTH, C.; EHLERT, S.; GRIMME, S. GFN2-xTB—An Accurate and Broadly Parametrized Self-Consistent Tight-Binding Quantum Chemical Method with Multipole Electrostatics and Density-Dependent Dispersion Contributions. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 15, n. 3, p. 1652–1671, 11 fev. 2019.

BELDA JR, Walter; CRIADO, Paulo Ricardo; PASSERO, Luiz Felipe Domingues. Successful treatment of chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* using imiquimod. **The Journal of dermatology**, v. 47, n. 4, p. 409-412, 2020.

BELDA JR, Walter et al. Chromoblastomycosis: New perspective on adjuvant treatment with acitretin. **Diseases**, v. 11, n. 4, p. 162, 2023.

BERNKOP-SCHNÜRCH, Andreas; DÜNNHAUPT, Sarah. Chitosan-based drug delivery systems. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 81, n. 3, p. 463-469, 2012.

BELAL, F. et al. Micellar liquid chromatography coupled with fluorometric detection for the determination of terbinafine in dosage forms and plasma. **J. Chromat. Sep. Tech.**, v. 8, p. 388, 2017.

BHATTARAI, Narayan; GUNN, Jonathan; ZHANG, Miqin. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 62, n. 1, p. 83-99, 2010.

BILIUTA, Gabriela et al. Development and Characterization of Polymeric Films Loaded with Terbinafine for Fungal Infection Treatment. **Polymers**, v. 17, n. 8, p. 1004, 2025.

BONTÉ, F. et al. Skin changes during ageing. **Subcellular Biochemistry**, v. 91, p. 249-280, 2019.

BOUWSTRA, J. A. et al. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. **Progress in Lipid Research**, v. 42, n. 1, p. 1-36, 2003.

CARDOSO, Camila Oliveira. Ionforese e nanopartículas lipídicas como estratégias para o tratamento tópico de doenças dermatológicas. 2025. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2025.

CHAMBERS, E. S.; VUKMANOVIC-STEJIC, M. Skin barrier immunity and ageing. **Immunology**, v. 160, n. 2, p. 116-125, 2019.

COSTA, R. H. F. et al. α -Cyclodextrin-based poly(pseudo)rotaxane for antifungal drug delivery to the vaginal mucosa. **Carbohydrate Polymers**, v. 302, 2023.

DA GLÓRIA SOUSA, Maria et al. Restoration of pattern recognition receptor costimulation to treat chromoblastomycosis, a chronic fungal infection of the skin. **Cell host & microbe**, v. 9, n. 5, p. 436-443, 2011.

DANIEL, J. S. P. et al. Erythromycin-excipients compatibility studies using the thermal analysis and dynamic thermal infrared spectroscopy coupled with chemometrics. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 143, n. 4, p. 3127-3135, 2021.

DA SILVA HELLWIG, Alessandra Helena et al. *In vitro* susceptibility of chromoblastomycosis agents to antifungal drugs: a systematic review. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 16, p. 108-114, 2019.

BRITO, Arival Cardoso de; BITTENCOURT, Maraya de Jesus Semblano. Chromoblastomycosis: an etiological, epidemiological, clinical, diagnostic, and treatment update. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 93, p. 495-506, 2018.

DE SOUSA, Maria da Glória Teixeira et al. Topical application of imiquimod as a treatment for chromoblastomycosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 58, n. 12, p. 1734-1737, 2014.

DE ANDRADE, Tânia Sueli et al. Chromoblastomycosis in the Amazon region, Brazil, caused by *Fonsecaea pedrosoi*, *Fonsecaea nubica*, and *Rhinocladiella similis*: Clinicopathology, susceptibility, and molecular identification. **Medical mycology**, v. 58, n. 2, p. 172-180, 2020.

DESAI, Nimeet et al. Chitosan: a potential biopolymer in drug delivery and biomedical applications. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 4, p. 1313, 2023.

DONNELLY, Ryan F. et al. Design and physicochemical characterisation of a bioadhesive patch for dose-controlled topical delivery of imiquimod. **International journal of pharmaceutics**, v. 307, n. 2, p. 318-325, 2006.

ELMOWAFY, M. Skin penetration/permeation success determinants of nanocarriers: Pursuit of a perfect formulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 203, n. March, p. 111748, 2021.

EL-KAMEL, Amal Hassan; ASHRI, Lubna Y.; ALSARRA, Ibrahim A. Micromatrical metronidazole benzoate film as a local mucoadhesive delivery system for treatment of periodontal diseases. **AAPS pharmscitech**, v. 8, n. 3, p. 75, 2007.

EOUANI, C. *et al.* In-vitro comparative study of buccal mucoadhesive performance of different polymeric films. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, n. 1, p. 45–55, 2001.

EVANS, D. J.; HOLIAN, B. L. The Nose–Hoover thermostat. **The Journal of Chemical Physics**, v. 83, n. 8, p. 4069–4074, 15 out. 1985.

FREDERIKSEN, Kit; GUY, Richard H.; PETERSSON, Karsten. Formulation considerations in the design of topical, polymeric film-forming systems for sustained drug delivery to the skin. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 91, p. 9-15, 2015.

GARCIA, M. A.; PINOTTI, A.; ZARITZKY, N. E. Physicochemical, water vapor barrier and mechanical properties of corn starch and chitosan composite films. **Starch/Staerke**, v. 58, n. 9, p. 453–463, 2006.

GHEZZI, M. *et al.* Improvement of Imiquimod Solubilization and Skin Retention via TPGS Micelles: Exploiting the Co-Solubilizing Effect of Oleic Acid. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 9, p. 1476–1476, 15 set. 2021.

GIBSON, M. **Pharmaceutical preformulation and formulation: a practical guide from candidate drug selection to commercial dosage form** (B. Raton, Ed.), 2001.

GOU, Si et al. Simultaneous Delivery of Econazole, Terbinafine and Amorolfine with Improved Cutaneous Bioavailability: A Novel Micelle-Based Antifungal “Tri-Therapy”. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 2, p. 271, 2022.

GRATIERI, T. *et al.* Princípios básicos e aplicação da iontoforese na penetração cutânea de fármacos. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1490–1498, 2008.

GREENMAN, J. Follicular pH and the Development of Acne. **International Journal of Dermatology**, v. 20, n. 10, p. 656–658, 1981.

GUPTA, P. An overview of applications of mucoadhesive buccal film in Oral Medicine. **Alternative drug delivery system**, v. 9, n. 2, 2020.

HALAT, D. H.; YOUNES, S; MOURAD, N.; RAHAL, M. Allylamines, benzylamines, and fungal cell permeability: a review of mechanistic effects and usefulness against fungal pathogens. **Membranes**, v. 12, n. 12, p. 1171, 2022.

HANNA, Edith; ABADI, Rami; ABBAS, Ossama. Imiquimod in dermatology: an overview. **International journal of dermatology**, v. 55, n. 8, p. 831-844, 2016.

HARRISON, L. I. *et al.* A pharmaceutical comparison of different commercially available imiquimod 5% cream products. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 20, n. 3, p. 160–164, 1 jan. 2009.

HASSAN, Shams ul et al. Topical delivery of terbinafine HCL using nanogels: a new approach to superficial fungal infection treatment. **Gels**, v. 9, n. 11, p. 841, 2023.

HOOVER, W. G. Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions. **Physical Review A**, v. 31, n. 3, p. 1695–1697, 1 mar. 1985.

HOSSAIN, ASM Monjur Al et al. Preparation, characterisation, and topical delivery of terbinafine. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 10, p. 548, 2019.

INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH). **ICH Harmonised Guideline: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R2)**. Geneva: ICH, 2023.

JAMSHAID, Humzah *et al.* A cutback in Imiquimod cutaneous toxicity. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, 2022.

JADHAV, Shital T. et al. Development and evaluation of imiquimod-loaded nanoemulsion-based gel for the treatment of skin cancer. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 1, p. 93, 2024.

Junqueira *et al.* **Histologia básica**. 13. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018, 554 p.

KANAKAPURA, Basavaiah; PENMATSA, Vamsi Krishna. Analytical methods for determination of terbinafine hydrochloride in pharmaceuticals and biological materials. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 3, p. 137-149, 2016.

KANATT, S. R. et al. Active chitosan-polyvinyl alcohol films with natural extracts. **Food Hydrocolloids**, v. 29, n. 2, p. 290–297, dez. 2012.

KELDER, J. et al. Polar Molecular Surface as a Dominating Determinant for Oral Absorption and Brain Penetration of Drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 10, p. 1514–1519, 1999.

KHAN, M. A. *et al.* Solubility enhancement and formulation strategies for poorly water-soluble drugs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, n. 9, p. 2575–2589, 2014.

KHAVKIN, J.; ELLIS, D. A. F. Aging skin: Histology, physiology, and pathology. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 19, n. 2, p. 229–234, 2011.

KHUTORYANSKIY, V. V. Advances in Mucoadhesion and Mucoadhesive Polymers. **Macromolecular Bioscience**, v. 11, n. 6, p. 748–764, 2011.

KIM, Sangseo et al. Development and optimization of imiquimod-loaded nanostructured lipid carriers using a hybrid design of experiments approach. **International Journal of Nanomedicine**, p. 1007-1029, 2023.

KONDOROS, Balázs Attila et al. Development of solvent-free Co-ground method to produce terbinafine hydrochloride cyclodextrin binary systems; structural and in vitro characterizations. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 4, p. 744, 2022.

KUMARI, Avnesh; YADAV, Sudesh Kumar; YADAV, Subhash C. Biodegradable polymeric nanoparticles-based drug delivery systems. **Colloids and surfaces B: biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1-18, 2010.

KUMINEK, Gislaine et al. Single crystal structure, solid state characterization and dissolution rate of terbinafine hydrochloride. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 78, p. 105-111, 2013.

LAIO, A.; PARRINELLO, M. Escaping free-energy minima. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 20, p. 12562–12566, 1 out. 2002.

LAPTEVA, Maria et al. Self-assembled mPEG-hexPLA polymeric nanocarriers for the targeted cutaneous delivery of imiquimod. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 142, p. 553-562, 2019.

LAYEK, Buddhadev et al. Design, development, and characterization of imiquimod-loaded chitosan films for topical delivery. **AAPS PharmSciTech**, v. 20, n. 2, p. 58, 2019.

LEONARDI, G. C. *et al.* Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). **International Journal of Oncology**, v. 52, n. 4, p. 1071–1080, 2018.

LIU, H. *et al.* Preparation and characterization of glycerol plasticized (high-amylose) starchchitosan films. **Journal of Food Engineering**, v. 116, n. 2, p. 588–597, 2013a.

LOGAN, Clare *et al.* Chromoblastomycosis treated with posaconazole and adjunctive imiquimod: lending innate immunity a helping hand. In: **Open Forum Infectious Diseases**. US: Oxford University Press, 2023. p. ofad124.

LUEPKE, N. P. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. **Food and Chemical Toxicology**, v. 23, n. 2, p. 287–291, 1985.

MICHALAK, M. *et al.* Bioactive compounds for skin health: A review. **Nutrients**, v. 13, n. 1, p. 1–31, 2021.

MOSER, Katrin *et al.* Passive skin penetration enhancement and its quantification *in vitro*. **European journal of pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, n. 2, p. 103-112, 2001.

MURA, Paola et al. Multiple roles of chitosan in mucosal drug delivery: an updated review. **Marine Drugs**, v. 20, n. 5, p. 335, 2022.

NAIR, A. B. *et al.* *In vitro* techniques to evaluate buccal films. **Journal of Controlled Release**, v. 166, n. 1, p. 10–21, 2013.

NEESE, F. Software Update: The ORCA Program System—Version 6.0. **WIREs Computational Molecular Science**, v. 15, n. 2, mar. 2025.

PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, R. et al. Testing vaginal irritation with the Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane assay. **Altex**, v. 35, n. 4, p. 495–503, 2018.

PAPADOPOULOU, V. *et al.* On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 309, n. 1–2, p. 44–50, 2006.

PEREIRA, M. N. *et al.* Nanostructured lipid carriers for hair follicle-targeted delivery of clindamycin and rifampicin to hidradenitis suppurativa treatment. **Colloids and Surfaces B Biointerfaces**, v. 197, p. 111448–111448, 7 nov. 2020.

PASSERO, Luiz Felipe Domingues; CAVALLONE, Italo Novais; BELDA JR, Walter. Reviewing the etiologic agents, microbe-host relationship, immune response, diagnosis, and treatment in chromoblastomycosis. **Journal of immunology research**, v. 2021, n. 1, p. 9742832, 2021.

PESCINA, Silvia *et al.* Microemulsions based on TPGS and isostearic acid for imiquimod formulation and skin delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 125, p. 223–231, 2018.

PATEL, V. M.; PRAJAPATI, B. G.; PATEL, M. M. Design and characterization of chitosancontaining mucoadhesive buccal patches of propranolol hydrochloride. **Acta Pharmaceutica**, v. 57, n. 1, p. 61–72, 2007.

PETROVÁ, Eliška *et al.* Nanoformulations for dermal delivery of imiquimod: the race of “soft” against “hard”. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 648, p. 123577, 2023.

PHATALE, V. *et al.* Overcoming skin barriers through advanced transdermal drug delivery approaches. **Journal of Controlled Release**, v. 351, p. 361–380, nov. 2022.

QUEIROZ-TELLES, Flavio *et al.* Chromoblastomycosis. **Clinical microbiology reviews**, v. 30, n. 1, p. 233–276, 2017.

RAMINENI, S. K. *et al.* Development of Imiquimod-Loaded Mucoadhesive Films for Oral Dysplasia. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 102, n. 2, p. 593–603, 1 fev. 2013.

RASOOL, Bazigha *et al.* Design and evaluation of a bioadhesive film for transdermal delivery of propranolol hydrochloride. **Acta Pharmaceutica**, v. 61, n. 3, p. 271–282, 2011.

REIS, T. A. *et al.* Simple and selective HPLC-UV/Vis bioanalytical method to determine aluminum phthalocyanine chloride in skin permeation studies. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2018, p. 1–7, 2018.

ROGER, M. *et al.* Bioengineering the microanatomy of human skin. **Journal of Anatomy**, v. 234, n. 4, p. 438–455, 2019.

ROJEK, Barbara; WESOŁOWSKI, Marek. A combined differential scanning calorimetry and thermogravimetry approach for the effective assessment of drug substance-excipient compatibility. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 148, n. 3, p. 845–858, 2023.

RYDER, N. S. Terbinafine: mode of action and properties of the squalene epoxidase inhibition. **British Journal of Dermatology**, v. 126, p. 2–7, 1992.

SACHDEVA, Vishal; SIDDOJU, Srujana; YU, Yi-Ying; KIM, Hyun D.; FRIDEN, Phillip M.; BANGA, Ajay K. Transdermal iontophoretic delivery of terbinafine hydrochloride: quantitation of drug levels in stratum corneum and underlying skin. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 388, n. 1–2, p. 24–31, 2010.

SANTOS, Daniel Wagner CL *et al.* The global burden of chromoblastomycosis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 15, n. 8, p. e0009611, 2021.

SIQUEIRA, Isaque Medeiros *et al.* Modulation of the immune response by *Fonsecaea pedrosoi* morphotypes in the course of experimental chromoblastomycosis and their role on inflammatory response chronicity. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 3, p. e0005461, 2017.

SIQUEIRA, Isaque Medeiros *et al.* Early immune response against *Fonsecaea pedrosoi* requires Dectin-2-mediated Th17 activity, whereas Th1 response, aided by Treg cells, is crucial for fungal clearance in later stage of experimental chromoblastomycosis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 6, p. e0008386, 2020.

SCHÖN, M. P.; SCHÖN, M. Imiquimod: mode of action. **British Journal of Dermatology**, v. 157, p. 8–13, 7 dez. 2007.

SMART, J. D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 11, p. 1556–1568, 3 nov. 2005.

SMITH, Dallas J. *et al.* Establishment of epidemiological cutoff values for *Fonsecaea pedrosoi*, the primary etiologic agent of chromoblastomycosis, and eight antifungal medications. **Journal of clinical microbiology**, v. 63, n. 5, p. e01903-24, 2025.

SORGI, Daisy *et al.* Imiquimod solubility in different solvents: an interpretative approach. **Pharmaceutics**, v. 16, n. 2, p. 282, 2024.

TANRIVERDI, Sakine Tuncay; POLAT, Süleyha Hilmioğlu; METIN, Dilek Yeşim; KANDILOĞLU, Gülşen; OZER, Ozgen. Terbinafine hydrochloride loaded liposome film formulation for treatment of onychomycosis: *in vitro* and *in vivo* evaluation. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 41, n. 10, p. 163–173, 2015.

TAVARES LUIZ, M. *et al.* The use of TPGS in drug delivery systems to overcome biological barriers. **European Polymer Journal**, v. 142, p. 110129, jan. 2021.

TELÒ, Isabella *et al.* Gel-like TPGS-based microemulsions for imiquimod dermal delivery: role of mesostructure on the uptake and distribution into the skin. **Molecular Pharmaceutics**, v. 14, n. 10, p. 3281-3289, 2017.

TELÒ, Isabella *et al.* Mechanisms of imiquimod skin penetration. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 511, n. 1, p. 516-523, 2016.

THATAI, Purva; SAPRA, Bharti. Terbinafine hydrochloride nail lacquer for the management of onychomycosis: formulation, characterization and *in vitro* evaluation. **Therapeutic Delivery**, v. 9, n. 2, p. 99-119, 2018.

THEIN-HAN, Wah Wah; STEVENS, Willem F. Transdermal delivery controlled by a chitosan membrane. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 30, n. 4, p. 397-404, 2004.

THIRAWONG, N. *et al.* Mucoadhesive properties of various pectins on gastrointestinal mucosa: An *in vitro* evaluation using texture analyzer. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, n. 1, p. 132–140, ago. 2007.

TOLENTINO, Seila *et al.* Chitosan-based mucoadhesive films loaded with curcumin for topical treatment of oral cancer. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 278, p. 134887, 2024.

TOLENTINO, Seila. **Filmes bioadesivos carregados com curcumina para o tratamento tópico de tumores orais e cutâneos. 2024.** Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2024.

TUNCAY TANRIVERDI, Sakine et al. Terbinafine hydrochloride loaded liposome film formulation for treatment of onychomycosis: *in vitro* and *in vivo* evaluation. **Journal of liposome research**, v. 26, n. 2, p. 163-173, 2016.

VEBER, D. F. et al. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615–2623, jun. 2002.

VECCHI, C. F. *et al.* Mucoadhesive polymeric films comprising polyvinyl alcohol, polyvinylpyrrolidone, and poloxamer 407 for pharmaceutical applications. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 26, n. 2, p. 138–149, 2021.

WONG, R. et al. The dynamic anatomy and patterning of skin. **Experimental Dermatology**, v. 25, n. 2, p. 92_98, 2016.

YOSHIDA, Cristiana MP; OLIVEIRA JUNIOR, Enio Nazare; FRANCO, Telma Teixeira. Chitosan tailor-made films: the effects of additives on barrier and mechanical properties. **Packaging Technology and Science: An International Journal**, v. 22, n. 3, p. 161-170, 2009.

ZAIDI, Z.; LANIGAN, S. W. Skin: Structure and Function. In: **Dermatology in Clinical Practice**. London: Springer London, 2010. p. 1–15.