

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE

Hanny Reis Mockdeci Gonçalves

NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE
Melaleuca alternifolia Cheel COMO PLATAFORMA INOVADORA NO
TRATAMENTO DA CANDIDÍASE OROFARÍNGEA

Juiz de Fora

2021

HANNY REIS MOCKDECI GONÇALVES

NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE
Melaleuca alternifolia Cheel COMO PLATAFORMA INOVADORA NO
TRATAMENTO DA CANDIDÍASE OROFARÍNGEA

Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em
Saúde, para obtenção do Título de Doutor em Saúde.
Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Juiz
de Fora.

Orientadora: Prof^a Dr^a Nádia Rezende Barbosa Raposo

Co-orientador: Prof. Dr. Guilherme Diniz Tavares

Juiz de Fora

2021

Hanny Reis Mockdeci Gonçalves

**NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL
DE *Melaleuca alternifolia* Cheel COMO PLATAFORMA INOVADORA NO
TRATAMENTO DA CANDIDÍASE OROFARÍNGEA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Saúde, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Saúde.

Aprovada em: 02/03/2021



AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a todos que estiveram comigo ao longo dessa jornada. Concluir essa etapa só foi possível devido ao apoio de pessoas muito especiais, que não mediram esforços para que meu objetivo fosse alcançado.

A Deus e a Nossa Senhora Aparecida, meus sinceros agradecimentos pela proteção e força para superar os percalços dessa caminhada, transformando-os em aprendizado.

Ao meu esposo, Dione, que da sua maneira, sempre incentivou o meu crescimento pessoal e profissional. Obrigada por acreditar em mim, as vezes mais do que eu mesma, pelo companheirismo e compreensão. Amo e admiro muito você.

Aos meus familiares, em especial às minhas irmãs e amigas, Rachel e Raissa, por sempre cuidarem de mim com tanto amor e dedicação. E ao Matheus, meu sobrinho e afilhado amado, por ressignificar a minha vida com a sua chegada, por todo carinho e alegria. Meu amor por vocês é imensurável.

À todas as minhas amigas, pela torcida e por entenderem a falta de tempo durante esse período.

A Universidade Federal de Juiz de Fora, por proporcionar grande parte da minha formação profissional. Ao Programa de Pós-graduação em Saúde da Faculdade de Medicina da UFJF, à CAPES e ao CNPq pelo auxílio durante todo o Doutorado e financiamento dessa pesquisa.

À professora e orientadora Nádia Rezende Barbosa Raposo, que no momento que eu mais precisei durante o Mestrado me recebeu de braços abertos em seu laboratório e equipe, confiando em meu trabalho. E quando eu já havia desistido de fazer o Doutorado, me incentivou mais uma vez a seguir a carreira acadêmica/científica. Você é um exemplo de dedicação, inteligência, eficiência, força e liderança. Serei eternamente grata por tudo que fez e faz por mim. Se hoje sou uma “Dentista com traços Farmacêuticos”, é porque você me ensinou que desafios são importantes para quem almeja a vitória.

À família Nupics, gostaria de dizer que é uma honra fazer parte dessa equipe tão capacitada, dedicada, produtiva e unida. Conviver e trabalhar com vocês diariamente é maravilhoso. Obrigada por toda paciência e ajuda. Ao José Márcio agradeço pelo convívio durante os experimentos da micro. Laura, obrigada por todo auxílio nos cálculos e nos ensaios de liberação e permeação, sua ajuda foi essencial. Alê, serei sempre grata por tudo que me ensinou na cultura de células. Laura, Alê, Poly, Marcela, Débora e Molise, deixo meus sinceros agradecimentos pela amizade e por tornarem essa jornada mais amena e alegre.

Ao professor e coorientador Guilherme Diniz Tavares, agradeço por confiar em mim, mesmo sabendo das minhas limitações em relação à formação. Obrigada por permitir adaptar o projeto para que ficasse mais próximo à minha profissão. Muitas vezes achei que não daria certo, mas com o apoio e incentivo de todos, em especial seu e da Nádia, foi sim possível.

Ao departamento de Química da UFJF, a Embrapa Gado de Leite de Juiz de Fora, a Universidade Federal de Santa Catarina e a Fundação Ezequiel Dias, que permitiram o desenvolvimento deste trabalho em suas instalações. Em especial, à professora, Carolina

de Paula Souza Moreira, que me recebeu sempre com tanto carinho, paciência e disposição. Meus sinceros agradecimentos.

À professora Renata Tôledo Alves, que com muito orgulho foi o nome da minha turma de graduação e hoje minha orientadora da especialização e membro da banca avaliadora, gostaria de dizer que nunca vou esquecer as palavras de incentivo desde a graduação. Se hoje retorno ao sonho da Odontopediatria, minha grande paixão, foi por ter exemplos como você. Exemplo de amor pelo que faz, de dedicação e de carinho. Muito obrigada por me ajudar a trilhar nessa linda estrada e por ser uma grande inspiração. Estendo esse agradecimento a todas as professoras e alunas (amigas) da especialização. Dividir com vocês esse período é enriquecedor e divertido.

À professora Maria das Graças Afonso Miranda Chaves, minha orientadora do Mestrado, que sempre acreditou na minha capacidade, pelas oportunidades, palavras acolhedoras e elogios. Obrigada por estar sempre comigo, pela torcida, abraços carinhosos e pela alegria e amor que demonstra pelo olhar.

Ao professor Hudson Caetano Polonini, gostaria de dizer que conviver com você é inspirador. Sua inteligência, dedicação e humildade são encantadoras. Obrigada por sempre estar disposto a me ajudar em tudo que precisei.

Ao professor Henrique Duque de Miranda Chaves Netto, que tanto me ensinou durante o Mestrado, agradeço pelos ensinamentos, por toda disposição e disponibilidade. Você é grande exemplo.

À professora Mônica Regina Pereira Senra Soares, sempre muito tranquila e solícita. Nos encontramos por um tempo no laboratório durante nosso Doutorado e dividimos nossas preocupações e ansiedades. Obrigada pela generosidade e por aceitar o convite para dar suas contribuições para esse trabalho.

Ao professor César Augusto Caneschi, pelo aceite em participar da banca e pelos ensinamentos passados durante os treinamentos de micro e antioxidante. Muito obrigada.

À professora Gisele Fabri, que me acompanha desde o Mestrado, sempre muito positiva e com palavras de incentivo e carinhosas. Obrigada por todo apoio sempre.

Se hoje eu cheguei ao fim dessa etapa foi por ter vocês comigo. Vocês são pilares dessa conquista!!! Muito obrigada!!!

“Educação não transforma o mundo. Educação muda as pessoas. Pessoas transformam o mundo”.

Paulo Freire

RESUMO

Espécies do gênero *Candida* spp. são frequentemente encontradas na microbiota bucal vivendo de forma comensal; mas podem mudar para o estado patogênico e gerar candidíase orofaríngea, que pode evoluir para candidemia. Apesar da importância clínica e epidemiológica dessas infecções, as opções terapêuticas são limitadas, o que tem estimulado a busca por novos medicamentos, dentre eles os de origem vegetal e o emprego da nanotecnologia como estratégia tecnológica. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo desenvolver uma plataforma inovadora para o tratamento da candidíase orofaríngea, constituída por um hidrogel contendo o óleo de *Melaleuca alternifolia* Cheel (OM) encapsulado em nanopartículas lipídicas sólidas (NLS). A composição química do óleo foi avaliada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. As NLS foram caracterizadas em relação ao tamanho hidrodinâmico médio das partículas (TP), índice de polidispersividade (PdI), potencial Zeta (PZ), eficiência de encapsulação (EE), morfologia, estabilidade, potencial antioxidante e citotoxicidade *in vitro* em linhagem celular de fibroblastos murinos (L929). As NLS contendo OM (OM-NLS) foram incorporadas em hidrogel e, em seguida, verificou-se a atividade antifúngica frente a leveduras padrão de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. guilliermondii*. Por fim, a permeação *ex vivo* do OM a partir do hidrogel, utilizando mucosa jugal suína foi analisada. Foram identificados treze constituintes no OM, cuja composição percentual atendeu aos padrões descritos pela ISO 4730: 2017. Quanto à caracterização das OM-NLS, os valores para TP, PdI e PZ foram $135,9 \pm 6,65$; $0,19 \pm 0,04$ e $-31,07 \pm 1,05$, respectivamente. As OM-NLS mostraram uma EE de $92,74\% \pm 0,012\%$ e revelaram uma forma esférica. Além disso, a atividade antioxidante variou de 14,1% a 17,2% e foi encontrado efeito citotóxico contra a linhagem celular L929 ($IC_{50} = 77,4 \mu\text{g/mL}$). Por pelo menos 120 dias, não foram observadas mudanças significativas nos valores da média de TP e PdI para OM-NLS, e o hidrogel contendo OM-NLS permaneceu estável por minimamente 30 dias, ambos sob refrigeração. OM-NLS e hidrogel contendo OM-NLS exibiram efeito fungicida (concentração fungicida mínima variou entre 5,60 e 11,20 mg/mL; e 5,53 e 11,06 mg/mL, respectivamente); e permeação transmucosa ($70,52\% \pm 3,85\%$). Concluiu-se que o hidrogel contendo OM-NLS apresentou efeito fungicida superando o OM, estabilidade durante o período de avaliação e foi permeável pela mucosa jugal suína, podendo ser, portanto um sistema de entrega promissor na candidíase orofaríngea.

Palavras-chave: Óleo de Melaleuca. Nanotecnologia. *Candida* spp. Fitoterapia.

ABSTRACT

Candida spp. species are commonly found in the oral microbiota residing as commensals; however, their status can change to pathogenic and cause oropharyngeal candidiasis, which can progress to candidemia. Despite the clinical and epidemiological importance of these infections, the therapeutic options are limited. This stimulates the search for new drugs, including those from natural sources, and technological strategies, such as nanotechnology. In this context, this study aimed to develop an innovative platform for the treatment of oropharyngeal candidiasis that comprises tea tree oil (TTO)-loaded solid lipid nanoparticles (SLN)-based hydrogel. The chemical composition of the oil was evaluated by gas chromatography coupled to mass spectrometry. The SLNs were characterized by the average hydrodynamic particle size (Z-average), polydispersity index (PdI), zeta potential (ZP), encapsulation efficiency (EE), morphology, stability, antioxidant potential, and *in vitro* cytotoxicity in a murine fibroblast cell line (L929). TTO-SLN were incorporated in hydrogel, and then the antifungal activity against standard yeasts such as *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, and *C. guilliermondii* was verified. Finally, *ex vivo* permeation of TTO from the hydrogel, using porcine buccal mucosa was analyzed. Thirteen constituents were identified in the TTO, whose percentage composition met the standards described by the ISO 4730: 2017. Regarding the TTO-SLN characterization, the respective values for Z-average, PdI, and ZP were 135.9 ± 6.65 ; 0.19 ± 0.04 and -31.07 ± 1.05 , respectively. TTO-SLN showed an EE of $92.74\% \pm 0.012\%$ and had a spherical shape. Additionally, the antioxidant activity ranged from 14.1% to 17.2%. TTO-SLN showed cytotoxic effect against L929 cell line ($IC_{50} = 77.4 \mu\text{g/mL}$). For at least 120 days, no significant changes were observed in the values of Z-average and PdI for TTO-SLN, and the TTO-loaded SLN-based hydrogel remained stable for at least 30 days, both under refrigeration. TTO-SLN and TTO-loaded SLN-based hydrogel exhibited fungicidal effect (minimum fungicidal concentration ranged between 5.60 and 11.20 mg/mL and between 5.53 and 11.06 mg/mL, respectively) and transmucosal permeation ($70.52\% \pm 3.85\%$). It was concluded the TTO-loaded SLN-based hydrogel showed fungicidal effect outperforming the TTO as well as stability during the period of evaluation, and it was permeable through porcine cheek mucosa. The developed TTO-loaded SLN-based hydrogel can be a promising drug delivery system in oropharyngeal candidiasis.

Keywords: Tea Tree Oil. Nanotechnology. *Candida* spp. Phytotherapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Anatomia da cabeça e pescoço.	18
Figura 2:	Formas clínicas mais comuns da candidíase orofaríngea.	21
Figura 3:	Esquema representativo da patogênese da candidemia.	23
Figura 4:	Eletromicrografias de espécies de <i>Candida</i> spp.	24
Figura 5:	<i>Melaleuca alternifolia</i> .	35
Figura 6:	Estrutura química do terpinen-4-ol.	38
Figura 7:	Ilustração esquemática de diferentes sistemas nanoparticulados.	40
Figura 8:	Esquema de ultrafiltração das OM-NLS.	48
Figura 9:	Perfil cromatográfico do óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> .	59
Figura 10:	Aspecto macroscópico das nanopartículas lipídicas sólidas contendo óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> (OM-NLS).	62
Figura 11:	Eletromicrografias de transmissão das nanopartículas lipídicas sólidas.	67
Figura 12:	Viabilidade celular de fibroblastos murinos em função dos tratamentos.	72
Figura 13:	Aspecto macroscópico do hidrogel contendo OM-NLS.	77
Figura 14:	Avaliação da estabilidade do hidrogel contendo OM-NLS sob diferentes condições de armazenamento (temperatura ambiente e sob refrigeração).	77
Figura 15:	Perfil de permeação <i>ex vivo</i> do terpinen-4-ol presente no hidrogel contendo OM-NLS em mucosa jugal suína	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Constituintes do óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> .	60
Tabela 2:	Características físico-químicas das nanopartículas produzidas em diferentes lotes.	63
Tabela 3:	Estudo da estabilidade (4 °C) das C-NLS e OM-NLS.	68
Tabela 4:	Verificação da atividade antifúngica das substâncias avaliadas.	79
Tabela 5:	Permeação do hidrogel contendo OM-NLS em mucosa jugal suína.	83
Tabela 6:	Parâmetros cinéticos para a permeação do hidrogel contendo OM-NLS em mucosa jugal suína	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ATCC	Coleção de cultura tipo americana (do inglês <i>American Type Culture Collection</i>)
CCT	Coleção de culturas tropicais
CE ₅₀	Concentração efetiva de 50%
CFM	Concentração fungicida mínima
CG	Cromatografia em fase gasosa
CG/EM	Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectroscopia de massas
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Instituto de normas clínicas e laboratoriais (do inglês <i>Clinical and laboratory standards institute</i>)
cm ²	Centímetro quadrado
C-NLS	Nanopartículas lipídicas sólidas controle
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
DMEM	<i>Meio Eagle</i> modificado por Dulbecco (do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EE	Eficiência de encapsulação
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
eV	Elétron-volt
x g	Gravidade
Hepes	Tampão 4-(2-HidroxiEtil)-1-PiperazinEtanolSulfônico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IAA	Índice de atividade antioxidante
IFA	Insumo farmacêutico ativo
IR	Índice de retenção
ISO	International organization for standardization
Js	Fluxo em estado estacionário
M	Molaridade
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura

mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MOPS	Ácido 3(N-morfolino) propanosulfônico
MTT	Brometo 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio
mV	Milivolt
NIQUA	Núcleo de identificação e quantificação analítica
NLS	Nanopartículas lipídicas sólidas
nm	Nanômetro
NP	Nanopartículas
O/A	Óleo/água
OM	Óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i>
OM-NLS	Nanopartículas lipídicas sólidas contendo óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i>
p	Probabilidade de significância
PdI	Índice de polidispersividade
PEO	Polióxidoetileno
pH	Potencial hidrogeniônico
PPO	Polióxidopropileno
PZ	Potencial Zeta
QSo	Quantidade do óleo quantificado no sobrenadante
QTo	Quantidade total do óleo adicionado à nanopartícula
rpm	Rotações por minuto
RPMI	Meio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDA	Ágar <i>Sabouraud</i> dextrose
SDB	Caldo <i>Sabouraud</i> dextrose (do inglês <i>sabouraud dextrose broth</i>)
SFB	Soro fetal bovino
spp.	Espécies
SUS	Sistema Único de Saúde
TL	Tempo de latência
TP	Tamanho hidrodinâmico médio da partícula
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
U/mL	Unidades por mililitro

UI	Unidade Internacional
μg	Micrograma
v/v	Volume/volume
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
%	Porcentagem
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
<	Menor

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 CANDIDÍASE OROFARÍNGEA E CANDIDEMIA	17
2.1.1 Agentes etiológicos	23
2.1.1.1 <i>Candida albicans</i>	24
2.1.1.2 <i>Candida krusei</i>	26
2.1.1.3 <i>Candida guilliermondii</i>	26
2.1.1.4 <i>Candida glabrata</i>	27
2.1.2 Tratamento farmacológico	28
2.1.2.1 Fitoterapia	31
2.1.2.1.1 <i>Melaleuca alternifolia</i>	34
2.1.2.1.2 Terpinen-4-ol	38
2.2 NANOTECNOLOGIA	39
2.2.1 Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS)	41
2.3 FORMAS FARMACÊUTICAS	42
2.3.1 Hidrogéis	43
3 OBJETIVOS	45
3.1 GERAL	45
3.2 ESPECÍFICOS	45
4 MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1 CARACTERIZAÇÃO CROMATOGRÁFICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Melaleuca alternifolia</i>	46
4.2 DESENVOLVIMENTO DAS NLS	46
4.2.1 Ensaios preliminares	46
4.2.2 Preparo das NLS	47
4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NLS	47
4.3.1 Avaliação do tamanho hidrodinâmico médio das partículas, índice de polidispersividade e potencial Zeta	47
4.3.2 Determinação da eficiência de encapsulação das OM-NLS	48
4.3.3 Avaliação morfológica das NLS	49
4.3.4 Determinação da estabilidade das NLS	50

4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE-----	50
4.5 CITOTOXICIDADE-----	51
4.6 DESENVOLVIMENTO DE HIDROGEL CONTENDO OM-NLS-----	52
4.7 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE CURTO PRAZO DO HIDROGEL CONTENDO OM-NLS-----	53
4.8 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA-----	54
4.8.1 Linhagens fúngicas avaliadas-----	54
4.8.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM)-----	54
4.9 AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO <i>EX VIVO</i> -----	55
4.9.1 Mucosa bucal suína -----	55
4.9.2 Características do ensaio-----	56
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	58
5.1 CARACTERIZAÇÃO CROMATOGRÁFICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Melaleuca alternifolia</i> -----	58
5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NLS-----	62
5.2.1 Avaliação do tamanho hidrodinâmico médio das partículas, índice de polidispersividade e potencial Zeta-----	62
5.2.2 Determinação da eficiência de encapsulação das OM-NLS-----	65
5.2.3 Avaliação morfológica das NLS-----	66
5.2.4 Determinação da estabilidade das NLS-----	67
5.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE-----	70
5.4 CITOTOXICIDADE-----	71
5.5 DESENVOLVIMENTO DO HIDROGEL CONTENDO OM-NLS E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE PRELIMINAR-----	76
5.6 ESTABILIDADE DO HIDROGEL CONTENDO OM-NLS -----	77
5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA-----	78
5.8 AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO <i>EX VIVO</i> -----	82
6 CONCLUSÃO -----	88
REFERÊNCIAS-----	89
ANEXO 1-----	115

1 INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas causam diversas mortes em todo o mundo, além de contribuírem com despesas significativas no setor de saúde pública (TOREY et al., 2016; WILLE et al., 2013; ZHOU et al., 2018). Dentre os diversos agentes etiológicos, destacam-se as espécies do gênero *Candida* spp., devido a suas elevadas prevalência e relevância (MORAIS-BRAGA et al., 2016; MOTTA et al., 2010; WILLE et al., 2013).

Aproximadamente 15 a 20 espécies de *Candidas* spp. foram descritas como causadoras de infecções, sendo a *Candida albicans* a de maior importância, responsável por 40% a 60% das candidíases (FELIPE et al., 2018; MATSUURA et al., 2015). No que se refere às *Candidas* não-*albicans*, ressaltam-se as *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* e *C. krusei*, as quais aumentam cada vez mais sua incidência mundialmente (AGHAZADEH et al., 2016; FORASTIERO et al., 2015; NADEEM, HAKIM e KAZMI, 2010; RAZZAGHI-ABYANEH et al., 2014; SOARES et al., 2018-a).

As *Candidas* spp. são frequentemente encontradas na microbiota bucal (BENSADOUN et al., 2011; KHAN, DHADED e JOS, 2016; MATSUURA et al., 2015). Entretanto, essas leveduras podem mudar o *status* de comensal para patogênico, o que ocorre principalmente em pacientes imunocomprometidos, gerando a candidíase (BENSADOUN et al., 2011; KHAN, DHADED e JOS, 2016; LÓPEZ-PINTOR et al., 2013; MATSUURA et al., 2015; SIQUEIRA et al., 2015).

A candidíase orofaríngea pode se apresentar como uma infecção dolorosa, sendo classificada como pseudomembranosa, eritematosa, hiperplásica ou queilite angular (BENSADOUN et al., 2011; CASSONE e CAUDA, 2012; COLLINS, COOKINHAM e SMITH, 2011). Se não tratada adequadamente, tem potencial para se estender ao esôfago ou evoluir para uma infecção sistêmica (candidemia) (BENSADOUN et al., 2011; MATSUURA et al., 2015). A candidemia é uma condição de difícil diagnóstico e tratamento (MATSUURA et al., 2015; VECCHIARELLI et al., 2012; WILLE et al., 2013), constituindo uma importante causa de morbi-mortalidade em pacientes hospitalizados em todo o mundo (AHANGARKANI et al., 2019; KURAOKA et al., 2018; MOTTA et al., 2010; WILLE et al., 2013), além de gerar grandes custos para o sistema de saúde (FELIPE et al., 2018; WILLE et al., 2013).

Apesar das relevâncias clínica e epidemiológica das infecções causadas por *Candida* spp., as opções terapêuticas são limitadas a três principais classes de

antifúngicos: azóis, equinocandinas e polienos (FIORINI et al., 2016; MORAIS-BRAGA et al., 2016; ROBBINS, WRIGHT e COWEN, 2016; SILVA-ROCHA et al., 2015). Inúmeros problemas são relatados para esses medicamentos, quanto ao espectro, potência, segurança, propriedades físico-químicas, biofarmacêuticas, farmacocinéticas, farmacodinâmicas e interações medicamentosas (PFALLER, 2012; SOLIMAN, 2017). Além disso, a evolução desses micro-organismos gerou resistência a diversos agentes antifúngicos, o que tem estimulado a busca por novos medicamentos mais eficazes e com menos efeitos colaterais, destacando nesse contexto a utilização de produtos de origem vegetal (AGHAZADEH et al., 2016; CANESCHI et al., 2020; FIORINI et al., 2016; MORAIS-BRAGA et al., 2016; SOARES et al., 2018-a; SOARES et al., 2018-b; TOREY et al., 2016; ZHOU et al., 2018). Tais fatos justificam a necessidade do desenvolvimento de insumos farmacêuticos ativos antifúngicos que ofereçam um tratamento seguro e eficaz (LUDWIG et al., 2019; PFALLER, 2012; TONON et al., 2018).

Em relação aos produtos naturais, estes vêm sendo usados na medicina popular há séculos e os óleos essenciais compõem um dos grupos mais utilizados (FELIPE et al., 2018; KONG et al., 2019). Dentre eles, destaca-se o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) (OM), também chamado de *tea tree oil*, o qual apresenta eficácia satisfatória no tratamento da candidíase (RASTEIRO et al., 2014; NOGUEIRA et al., 2014).

Como estratégia promissora para a melhoria da ação de bioativos, é pujante o emprego da nanotecnologia, sendo crescente o desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), pela facilidade de produção e pela estabilidade do sistema. Especificamente em relação às nanopartículas contendo OM, além do aumento da estabilidade, eficácia e segurança, a nanoestruturação possibilita a liberação sítio-específica (BALDISSERA et al., 2014; GE e GE, 2015; LAUTERBACH e MÜLLER-GOYMANN, 2015).

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi desenvolver uma plataforma inovadora para o tratamento da candidíase orofaríngea, constituída por um hidrogel mucoadesivo contendo OM encapsulado em NLS.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CANDIDÍASE OROFARÍNGEA E CANDIDEMIA

Os fungos são encontrados na natureza em associação com plantas e mamíferos, por isso, os seres humanos são continuamente expostos aos seus múltiplos gêneros, principalmente através da ingestão de alimentos, permitindo a colonização do trato gastrointestinal. Dependendo da interação entre os mecanismos de defesa da mucosa do hospedeiro, os fatores de virulência fúngica e a utilização de antifúngicos, a colonização pode ser transitória ou persistente e pode haver doença local. Dos numerosos fungos patogênicos, a *Candida* spp. representa o gênero predominante (CORRÊA, 2017; LÓPEZ-PINTOR et al., 2013; SIQUEIRA et al., 2015; VAZQUEZ, 2010). Esses microorganismos são responsáveis por 80% das infecções fúngicas (MATSUURA et al., 2015).

A cavidade bucal e os tratos gastrointestinal e vaginal são os locais mais comuns de ocorrência da candidíase. Dentre as candidíases mucocutâneas, destaca-se a candidíase orofaríngea (ARRAES, 2012; COLLINS, COOKINHAM e SMITH, 2011; VECCHIARELLI et al., 2012).

A orofaringe está localizada entre o palato duro e o osso hióide. É delimitada posteriormente pela língua, incluindo seu terço posterior (base da língua), até o topo (ápice) da epiglote. Abrangendo as tonsilas palatinas, palato mole, mucosa da orofaringe, músculos constritores no nível do palato e pela mucosa que recobre a segunda e a terceira vértebras cervicais. Superiormente, delimita-se por uma linha horizontal que passa pelo palato e, inferiormente, por uma linha horizontal que passa no nível do osso hióide. É demarcada, anteriormente, pela cavidade bucal. Lateralmente, é limitada por dois arcos, um anterior, formado pelo músculo palatoglosso e outro, pelo músculo palatofaríngeo (MARTA, 2013; SOUZA et al., 2005) (Figura 1).

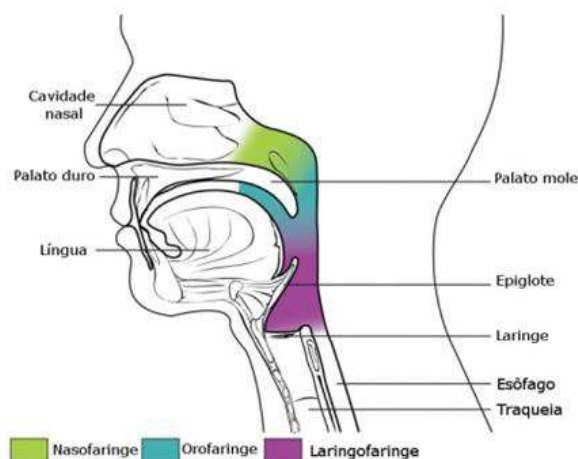


Figura 1: Anatomia da cabeça e pescoço. Fonte: <http://www.doutorarnaldo.org/index.php/dicas-de-prevencao/69-cancer-de-boca-e-orofaringe>. Acessado em 11 de julho de 2018.

A candidíase pode variar desde lesões superficiais, até disseminações sistêmicas (MATSUURA et al., 2015). Ocorre em todas as idades, porém, apresenta sintomas mais agressivos especialmente em bebês e idosos (VECCHIARELLI et al., 2012). As taxas de incidência em crianças variam de 5,4% a 71,3% e em adultos de 3% a 48% (CABRAL, 2014). Os extremos do ciclo de vida humana (infância e velhice) constituem os períodos em que a ocorrência de candidíase é mais comum, em decorrência da imaturidade ou deficiência do sistema imunológico (ARRAES, 2012).

O risco aumentado de doença clínica é observado em fumantes, pessoas com xerostomia, pacientes que fazem uso de esteroides e antibióticos, portadores de próteses dentárias, desnutridos, gestantes, pessoas com má higiene bucal e indivíduos imunocomprometidos (principalmente portadores do vírus da imunodeficiência humana – HIV – ou em tratamento de neoplasias malignas) (DE ROSSI et al., 2011; FAVALESSA et al., 2010; LÓPEZ-PINTOR et al., 2013; NETO et al., 2005; NEVILLE et al., 2009). Nos últimos, a chance de desenvolvimento de infecção sistêmica é elevada (VECCHIARELLI et al., 2012).

A candidíase orofaríngea é a mais comum das infecções em indivíduos HIV positivos (90% dos mesmos) (CASSONE e CAUDA, 2012). Tem elevado índice de acometimento também em pacientes durante e após tratamentos neoplásicos (COLLINS, COOKINHAM e SMITH, 2011; NIKOLIC et al., 2017). Para Davies, Brailsford e Beighton (2006), a prevalência nas pessoas com câncer é de 5% a 60% nos portadores de tumores sólidos; 20% a 80% nos submetidos a transplante autólogo de medula óssea e 50% nos pacientes com câncer de cabeça e pescoço, sendo que a radioterapia e a

quimioterapia dessas regiões estão associadas a um risco significativamente elevado de infecção fúngica bucal. López-Pintor e colaboradores (2013) destacaram que as infecções por *Candida* spp. também são altamente prevalentes após o transplante de órgãos, tendo os índices de acometimento variando de 7,7% a 46,7%. Collins, Cookinham e Smith (2011) ressaltaram que a candidíase orofaríngea, diferentemente da candidíase esofágica, está associada a desequilíbrios muito pequenos na resposta imunológica local do hospedeiro, como os observados com o uso de terapia antibacteriana tópica ou sistêmica, corticosteroides inalatórios ou sistêmicos e diabetes.

Fatores locais que alterem a mucosa ou diminuam a qualidade ou a quantidade de saliva podem ser promotores do aumento do risco de desenvolvimento de candidíase orofaríngea (LÓPEZ-PINTOR et al., 2013). A associação da candidíase com a xerostomia pode ser explicada pelo fato do fluxo salivar auxiliar na eliminação de leveduras e bactérias durante a deglutição, o que pode ser facilitado pela ligação dos microorganismos às mucinas e proteoglicanos salivares. A redução desse fluxo (devido à mucosite, radiação, quimioterapia ou hipossalivação) ocasiona aumento na colonização da levedura salivar. A lisozima, a lactoferrina, as histatinas e os anticorpos (imunoglobulina A secretora) funcionam como fatores antimicrobianos salivares, os quais inibem a colonização e adesão fúngica. O pH da saliva também é um componente da defesa da mucosa. O ácido pode induzir uma maior expressão de fatores de virulência fúngica, como a aspartil proteinase, considerada um elemento importante da virulência da *Candida* spp. (BENSADOUN et al., 2011; CABRAL, 2014; SILVA et al., 2008).

Em relação ao uso de antibióticos e o desenvolvimento da candidíase, a explicação se baseia na competição que ocorre entre a microbiota bacteriana residente com a levedura pelo acesso a nutrientes, o que limita a proliferação de patógenos. Qualquer mudança que afete a microbiota bacteriana residente pode promover a proliferação dos fungos (BENSADOUN et al., 2011, VAZQUEZ, 2010).

Quanto à imunidade, quando o número de células de defesas está reduzido, pode ocorrer maior proliferação fúngica, uma vez que os macrófagos e as células de Langerhans fazem a fagocitose das leveduras e a apresentação às células T no tecido conjuntivo, considerados os principais efetores da imunidade adaptativa (BENSADOUN et al., 2011).

Fatores de virulência fúngica também devem ser levados em consideração para se entender a transição da colonização para a infecção. O primeiro fenômeno que deve

acontecer é a adesão epitelial, o qual envolve as adesinas proteicas e as glicoproteicas, como a manoproteína de 65 kDa (mp65) da levedura. O segundo passo é a replicação fúngica e invasão de tecidos, com base nas capacidades de filamentação da *Candida spp.*, e a secreção de fosfolipases e de proteases, incluindo aspartil proteases, expressas especificamente na candidíase orofaríngea, mas não vistas durante a colonização. No caso de defesas limitadas do hospedeiro (imunocomprometidos), pode ocorrer a mudança do fenótipo fúngico (BENSADOUN et al., 2011).

O diagnóstico da candidíase orofaríngea é feito na maioria dos casos baseado no exame clínico. Pode-se optar também por um esfregaço da lesão. Através da escarificação das lesões e da aplicação de uma preparação de hidróxido de potássio (KOH) ou coloração de Gram, o diagnóstico pode ser confirmado laboratorialmente, identificando-se leveduras em brotamento ou pseudo-hifas. Se houver recorrência do aparecimento da patologia ou resistência ao tratamento prévio, a cultura é um auxiliar para identificar se o agente é uma espécie mais resistente, como a *C. glabrata* ou a *C. krusei* (BOATTO et al., 2007; CORRÊA, 2017; ZIMMERMANN, et al., 2009). No entanto, segundo Neville e colaboradores (2009), a cultura não é o método mais confiável para diagnosticar se é ou não candidíase; serve apenas para verificar qual o micro-organismo específico responsável pela patologia quando a mesma já foi diagnosticada, uma vez que muitos pacientes abrigam espécies de *Candida spp.* sem apresentarem a doença clínica. A biópsia pode ser utilizada nos casos de resistência ao tratamento ou na possível presença de uma lesão fúngica secundária a outra alteração primária não diagnosticada clinicamente (NEVILLE et al., 2009).

Os principais sinais e sintomas são: dor; ardor; irritação na língua; xerostomia; odinofagia; disgeusia; e cheiro característico de infecções por fungos. As formas clínicas mais comuns são a pseudomembranosa, eritematosa, hiperplásica e a queilite angular (Figura 2). A pseudomembranosa é caracterizada por manchas brancas de consistência cremosa e indolor ou placas na língua, palato, mucosa bucal ou orofaringe, as quais podem ser removidas, revelando uma mucosa eritematosa. O tipo eritematoso apresenta-se como um eritema na região da língua ou mucosa bucal, sem a formação de placa (CASSONE e CAUDA, 2012; COLLINS, COOKINHAM e SMITH, 2011; MANGUEIRA, MANGUEIRA e DINIZ, 2010; NEVILLE et al., 2009). As membranas mucosas podem parecer secas, vermelhas e vidradas. Quando envolve a língua, geralmente está presente no meio do dorso com perda de papilas linguais e eritema,

podendo haver lesão de contato palatina (CORRÊA, 2017). A hiperplásica tem como características a presença de manchas brancas firmemente aderidas na mucosa bucal bilateralmente, na língua ou no palato (COLLINS, COOKINHAM e SMITH, 2011). A queilite angular consiste em fissuras dolorosas nas comissuras da boca, as quais, em alguns casos, podem apresentar-se com aspecto hiperkeratótico, sendo que ulcerações e rachaduras podem aparecer em estágios mais avançados (BENSADOUN et al., 2011; CASSONE e CAUDA, 2012).

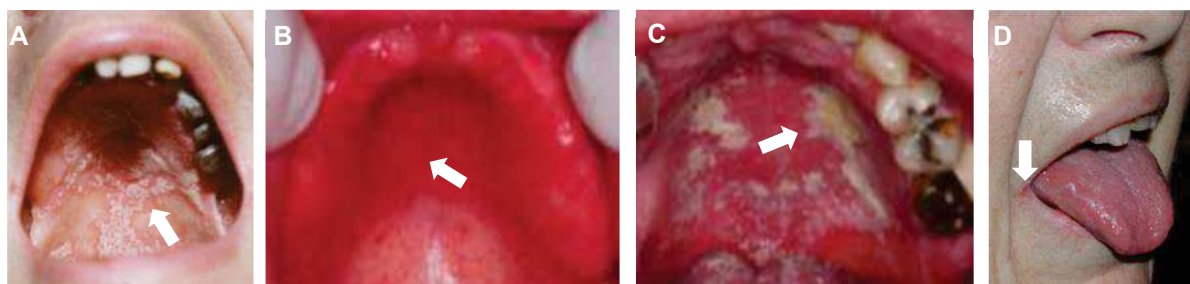


Figura 2: Formas clínicas mais comuns da candidíase orofaríngea. A - pseudomembranosa; B - eritematosa; C - hiperplásica; e D - queilite angular. Fonte: Adaptado de Bensadoun e colaboradores (2011) e Neville e colaboradores (2009).

Em casos mais graves de candidíase orofaríngea, a infecção pode causar dor intensa e anorexia, sintomas que afetam a qualidade de vida dos pacientes e propiciam a perda de peso e alterações na condição de saúde geral (BENSADOUN et al., 2011). Se não tratada adequadamente, há a possibilidade de se estender ao esôfago ou evoluir para uma infecção sistêmica (candidemia) (MATSUURA et al., 2015). No caso de candidemia, as leveduras podem atingir diferentes órgãos e tecidos como os pulmões, as meninges, os rins, a bexiga, as articulações, o fígado, o coração e os olhos, resultando na formação de microabscessos nas regiões supracitadas (ARRAES, 2012).

Infecções sanguíneas causadas por espécies de *Candida* spp. constituem importante causa de morbi-mortalidade em pacientes hospitalizados em todo o mundo (AHANGARKANI et al., 2019; KURAOKA et al., 2018; MOTTA et al., 2010; WILLE et al., 2013). Representam a principal micose invasiva que ocorre em indivíduos hospitalizados, com elevada incidência mundial em hospitais de atendimento terciário (NUCCI et al., 2013). Essa condição é geralmente de difícil diagnóstico e tratamento; as taxas de mortalidade variam entre 30% e 60%, dependendo do estado clínico do hospedeiro (MATSUURA et al., 2015; VECCHIARELLI et al., 2012; WILLE et al., 2013), além de gerar grandes custos para o sistema de saúde (FELIPE et al., 2018; WILLE et al., 2013).

Existe uma grande variação na incidência de candidemia relatada na literatura, o que pode ser explicado pelas diferenças entre as populações e os variados fatores de risco (MOTTA et al., 2010). No Brasil, ela é duas vezes maior que em outros países, com média de 2,49 casos por 1.000 internações. Em contrapartida, nos Estados Unidos da América (EUA) a média variou entre 0,28 a 0,96; Canadá 0,45 e países da Europa 0,20 a 0,38 em cada 1.000 indivíduos internados (ARRAES, 2012). Em hospitais públicos brasileiros, a *C. albicans* foi a espécie mais isolada, seguida de *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* (MOTTA et al., 2010). Ahangarkani e colaboradores (2019) relataram que embora a *C. albicans* seja geralmente a causa mais comum de candidemia, as espécies de *Candida* não-*albicans* (*C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. auris* e *C. guilliermondii*) tornam-se cada vez mais frequentes e têm sido reconhecidas como patógenos emergentes. Nucci e colaboradores (2013) destacaram o elevado índice de crianças brasileiras (não apenas neonatos) afetadas por essa patologia.

A maior parte dos casos de candidemia é adquirida por via endógena, devido à translocação de leveduras do gênero *Candida* spp. presentes na microbiota de vários sítios anatômicos e sob condições de debilidade do hospedeiro, comportam-se como patógenos oportunistas. A presença de uma predisposição local e/ou generalizada que provoque desequilíbrio da microbiota ou lesão da mucosa gastrintestinal pode ser um agente facilitador de translocação da levedura até os capilares mesentéricos (Figura 3). A transmissão por via exógena acontece, principalmente, através das mãos de profissionais da saúde que cuidam dos pacientes e materiais médico-hospitalares (soluções intravenosas e catéteres contaminados) (ARRAES, 2012; GIOLO e SVIDZINSKI, 2010).

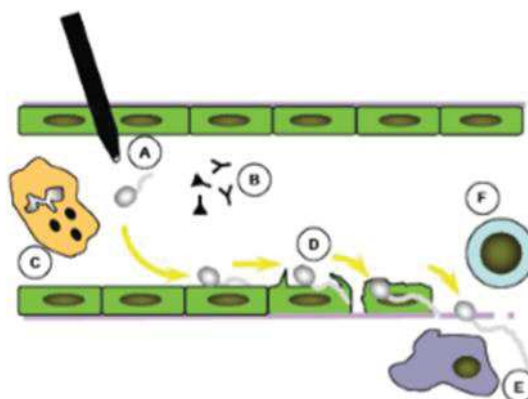


Figura 3: Esquema representativo da patogênese da candidemia. A- Penetração de células de *Candida* spp. no espaço endovascular através de translocação intestinal e/ou procedimentos invasivos; B- Multiplicação das células da levedura na corrente sanguínea; C- Interação com componentes solúveis do soro e neutrófilos circulantes; D- Adesão e penetração do micro-organismo no endotélio vascular com acesso aos órgãos profundos, onde interagem com células dendríticas-E; F- Ativação da resposta imunológica. Fonte: Arraes (2012).

Uma série de fatores de risco pode levar à maior chance de desenvolvimento da candidemia, dentre os quais se destacam: imunossupressão; insuficiência renal; quimioterapia; radioterapia; diabetes; lesão de mucosas; hemodiálise; cirurgia prévia; corticoterapia; uso de antibióticos de largo espectro; tempo prolongado de internação hospitalar; neutropenia; nutrição parental; sonda vesical; ventilação mecânica; catéter venoso central e colonização de vários sítios anatômicos por leveduras (CORRÊA, 2017).

2.1.1 Agentes etiológicos

O gênero *Candida* spp. foi reconhecido no Congresso Botânico Internacional em 1959 (COLOMBO et al., 2013). São fungos leveduriformes, não dermatófitos, pertencentes ao reino Fungi, divisão Eumycota, subdivisão Deuteromycotina, classe Blastomycetes, família Cryptococcacea (BHATTA, KEYAL e WANG, 2016; METIN, DILEK e DEMIRSEVEN, 2015).

É o principal entre as leveduras, com aproximadamente 200 espécies (CORRÊA, 2017; SIDRIM e ROCHA, 2004). No entanto, apenas cerca de 15 a 20 delas foram descritas como causadoras de infecções, sendo a *Candida albicans* um importante agente etiológico (entre 40% a 60%) (FELIPE et al., 2018; MATSUURA et al., 2015). Dentre as *Candidas* não-*albicans*, destacam-se as espécies *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* e *C. krusei*, pelo aumento global da frequência de isolamento (AGHAZADEH et al., 2016; FORASTIERO et al., 2015; NADEEM, HAKIM e KAZMI, 2010; RAZZAGHI-ABYANEH et al., 2014; SOARES et al., 2018-a). Apesar de a

Candida albicans representar a espécie mais comum, ela está presente nos estágios iniciais da formação dos biofilmes, sendo que em estágios posteriores, pode ocorrer o aparecimento de outras espécies (GASPAROTO et al., 2009; MÍMICA et al., 2009).

Dentre as espécies de *Candidas* spp., existem diversidades genética e morfológica, porém a maioria delas é capaz de produzir blastoconídeos, pseudo-hifas e clamidósporos (COLOMBO et al., 2013). Reproduzem-se assexuadamente por brotamento ou gemulação; seus tamanhos variam entre 2 a 6 μm aproximadamente e as colônias apresentam coloração branca a creme, com superfície lisa ou rugosa, forma ovóide ou esférica (ARRAES, 2012; CORRÊA et al., 2017) (Figura 4).

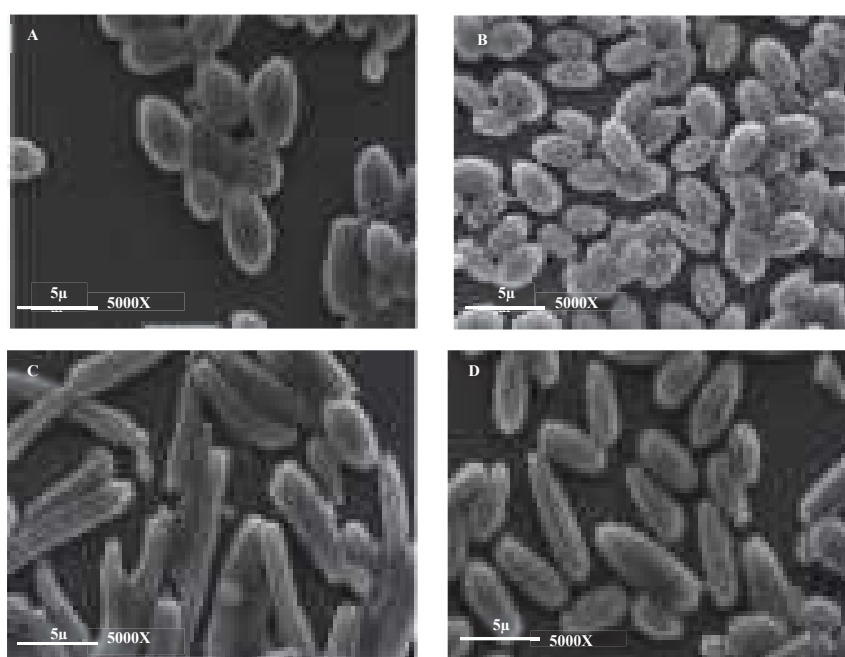


Figura 4: Eletromicrografias de espécies de *Candida* spp. **A-** *Candida albicans* American Type Culture Collection (ATCC) 10231; **B-** *Candida glabrata* (Taniwaki, M.H.) Coleção de culturas tropicais (CCT) 0728; **C-** *Candida krusei* (FTI) CCT 1517; e **D-** *Candida guilliermondii* CCT 1890. Aumento de 5000x. Barra de escala 5 μm . Fonte: Adaptado de Soares et al. (2018-a).

2.1.1.1 *Candida albicans*

A *Candida albicans* é o patógeno fúngico oportunista mais difundido no microbioma humano (MOHAMMED, DHADED e JOSHI, 2016; ZHOU et al., 2018). Está presente em 60% a 70% da microbiota bucal de indivíduos saudáveis (FIORINI et al., 2016). Embora a presença de levedura não seja, por si só, indicativa de infecção bucal, alguns fatores locais e sistêmicos podem ser responsáveis pela conversão de uma forma comensal para parasita, liberando a levedura da competição biológica com a bactéria e permitindo a transformação em patógenos (MOHAMMED, DHADED e JOSHI, 2016).

É considerada uma das principais causas de candidíase e mortalidade humana, principalmente em imunocomprometidos (ZHOU et al., 2018).

Durante o parto normal ou logo após o nascimento, a parede do trato gastrintestinal é colonizada por esse fungo, que então passa a viver de forma comensal no organismo humano e é frequentemente isolado da pele, da boca e da vagina. É um micro-organismo diploide, com um ciclo de vida complexo e diferentes formas de crescimento, sendo as principais a levedura unicelular e hifas multicelulares (CASSONE e CAUDA, 2012; VECCHIARELLI et al., 2012). Sua reprodução ocorre de forma assexuada por brotamento e divisão binária simples, o que permite a formação das pseudo-hifas, além de apresentar a capacidade de desenvolvimento do tubo germinativo e hifas verdadeiras (AKÇAĞLAR, ENER e TÖRE, 2011). O período para que ocorra seu crescimento é de 24 a 48 horas à temperatura de 37 °C (BROOKS et al., 2012). Destaca-se a capacidade de apresentar o fenômeno denominado morfogênese, no qual ele passa da forma levedura para a forma de hifas, o que contribui para a invasão tecidual (SILVA-ROCHA et al., 2015).

Possui formato ovóide e tamanho que varia entre 3-6 µm (AKÇAĞLAR, ENER e TÖRE, 2011). Macroscopicamente, demonstra textura e consistência cremosa, superfície lisa e coloração branca ou bege (BROOKS et al., 2012).

A capacidade da levedura de aderir a qualquer substrato é um dos motivos que facilita o seu elevado índice de patogenicidade. Adere tanto em superfícies bióticas (como dentes e mucosas), como em abióticas (como próteses dentárias, aparelhos ortodônticos e restaurações dentárias). A hidrofobicidade da superfície celular contribui para que essa espécie consiga aderir às superfícies inertes, além de possuir significativa termotolerância e produzir enzimas como proteinases e fosfolipases (ARRAES, 2012; MATSUURA et al., 2015).

Diversos fatores contribuem para a formação de resistência microbiana da *Candida albicans* aos antifúngicos, dentre os quais estão: a mutação e recombinação mitóticas, com formação de componentes-alvo dos antifúngicos com menor afinidade de ligação a eles; superexpressão de bombas de efluxo; e formação de biofilmes (FORD et al., 2015; LÓPEZ-ÁVILA et al., 2016; VIEIRA e SANTOS, 2017).

2.1.1.2 *Candida krusei*

A *Candida krusei* é um micro-organismo diploide que participa da fermentação de várias frutas e produtos lácteos, além de ser um patógeno oportunista, representando uma das cinco espécies mais patogênicas de *Candida* spp., com capacidade de causar infecções fatais (ELICHAROVA et al., 2019). Por ter características mais hidrofóbicas, adere-se fortemente aos catéteres e implantes e não forma hifas verdadeiras (CHEN et al., 2019).

Tem uma prevalência baixa entre as infecções causadas por fungos (20%), porém tem sido descrita como um importante agente causador de infecções fúngicas sistêmicas, resultando em taxas de sobrevivência abaixo de 90 dias (53,6%) (FORASTIEIRO et al., 2015). É um patógeno hospitalar ocasional, particularmente, em portadores de doenças hematológicas malignas e/ou submetidos a transplante de medula óssea e pacientes idosos. Nos EUA e na Europa é mais frequente como agente etiológico de candidemias, do que na América Latina (ARRAES, 2012).

Possui resistência intrínseca ao fluconazol, o que gera preocupações epidemiológicas e terapêuticas (CHEN et al., 2019; ELICHAROVA et al., 2019; FORASTIEIRO et al., 2015; KURAOKA et al., 2018; MULTANI, SUBRAMANIAN e LIU, 2019; PORTE et al., 2012), além de reduzida suscetibilidade à anfotericina B (ELICHAROVA et al., 2019). As equinocandinas demonstram ser as substâncias mais ativas contra essa espécie (FORASTIERO et al., 2015; PFALLER et al., 2008).

2.1.1.3 *Candida guilliermondii*

A *Candida guilliermondii* vive de forma saprófita no organismo humano, sendo considerada como um isolado incomum, o qual se comporta como um fungo ambiental e um agente de infecções sérias envolvendo pacientes com neoplasias (SAVINI et al., 2010). Antigamente, estava relacionada apenas a onicomicoses, porém, com o passar dos anos vem sendo associada a casos de candidemia em neutropênicos, transplantados e pacientes internados em unidades de terapia intensiva (ARRAES, 2012).

Segundo Ahangarkani e colaboradores (2019), a taxa de incidência de candidemia por *C. guilliermondii* varia de 0,6% na América do Norte a 3,7% na América Latina, sendo mais frequente em adultos e com múltiplos fatores de risco (como neoplasias, catéteres venosos centrais) e indivíduos internados em unidades de terapia intensiva. As taxas de mortalidade por candidemia causada por essa espécie variaram de 11,76-66,6%, 13,6-54%, 16,66-18,8%, 59,25% e 3,4% no Japão, Espanha, Taiwan, EUA e Itália,

respectivamente. Para esses autores, o diagnóstico precoce e a rápida instituição da terapia antifúngica apropriada para essa infecção melhoram significativamente a taxa de sobrevida dos pacientes.

Apresenta reduzida sensibilidade para todas as classes de antifúngicos; entretanto, os mais efetivos para o tratamento de infecções por essa espécie são os polienos e as equinocandinas. Esta característica é considerada relevante quando se pensa no surgimento de cepas clínicas resistentes (AHANGARKANI et al., 2019; ARENDRUP, 2013; BARBEDO e SGARBI, 2010; SAVINI et al., 2010; TAVERNA et al., 2018).

2.1.1.4 *Candida glabrata*

A *Candida glabrata* também é um micro-organismo saprófita do organismo humano, o qual raramente causa infecções sérias. Contudo, devido ao aumento de fatores como uso indiscriminado de antibióticos, terapia antimicótica de largo espectro, aumento de pessoas imunocomprometidas e o envelhecimento da população, a frequência das infecções sistêmicas e da mucosa causadas por ela teve um aumento significativo e vem se tornando a segunda espécie mais isolada em pacientes com candidíases, o que revela elevado índice de mortalidade em hospitalizados (ARRAES, 2012; BODEY et al., 2002). Emerge como um notável patógeno da mucosa bucal, sendo que na candidíase orofaríngea pode ser mais severa e mais difícil de ser tratada, se comparada com *C. albicans* (CABRAL, 2014).

O dimorfismo não está presente na *C. glabrata*, como nas outras espécies, sendo encontrada como blastoconídeo, tanto na forma comensal, como na patogênica, não formando pseudohifas em temperaturas acima de 37 °C. Suas colônias são de coloração creme e menores do que as de *C. albicans* (ARRAES, 2012; CABRAL, 2014).

Essa espécie possui resistência inata e adquirida aos antifúngicos convencionais, principalmente ao fluconazol, devido à sua capacidade de modificar a biossíntese do ergosterol e a função mitocondrial. Tal resistência contribui para o aparecimento de infecções em indivíduos imunocomprometidos (COLOMBO et al., 2013-b; KURAOKA et al., 2018; LI, REDDING e DONGARIBAGTZOGLOU, 2007). Alexander e colaboradores (2013-b) relataram a crescente resistência às equinocandinas. Além disso, a taxa de mortalidade por esse micro-organismo é elevada, quando comparada com outras espécies de *Candidas* não-*albicans*. Adicionalmente, tem sido apontada como causa de sepse neonatal e em pacientes idosos (CABRAL, 2014).

2.1.2 Tratamento farmacológico

Apesar das relevâncias clínica e epidemiológica das infecções causadas por fungos do gênero *Candida* spp., as opções terapêuticas atualmente disponíveis estão limitadas a três principais classes de antifúngicos: azóis, equinocandinas e polienos (FIORINI et al., 2016; MORAIS-BRAGA et al., 2016; ROBBINS, WRIGHT e COWEN, 2016; SILVA-ROCHA et al., 2015).

Nas formas mais leves de candidíase, os tratamentos locais com polienos ou azóis são recomendados como terapia de primeira escolha. Esses compostos podem ser administrados sob a forma de suspensão ou creme, para serem aplicados intrabucalmente (BENSADOUN et al., 2011). Os mais usados topicamente são a nistatina e o clotrimazol e, sistemicamente, os azóis (cetoconazol, fluconazol, itraconazol e posaconazol, dentre eles, o mais utilizado é o fluconazol) e anfotericina B (AGHAZADEH et al., 2016; BENSADOUN et al., 2011; VAZQUEZ, 2010). Os tratamentos sistêmicos geralmente são aplicados em casos de insucesso do tratamento tópico ou em indivíduos com candidíase orofaríngea em estágio grave ou ainda em pacientes de alto risco (imunocomprometidos) (BENSADOUN et al., 2011; VAZQUEZ, 2010).

Como nem a nistatina e nem a anfotericina B são absorvidas pelo trato gastrointestinal, a administração das mesmas deve ocorrer de forma frequente, para que os tecidos mucosos infectados recebam uma exposição adequada a esses fármacos (VAZQUEZ, 2010).

Os polienos ligam-se ao ergosterol da membrana celular fúngica, levando à formação de poros que permitem o extravasamento de material intracelular, potássio e conseqüentemente, culminam na morte celular (KATHIRAVAN et al., 2012; PERLIN, RAUTEMAA-RICHARDSON e ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017; ROBBINS, WRIGHT e COWEN, 2016). Os mais conhecidos são a anfotericina B e a nistatina. A anfotericina B é muito empregada em tratamentos de infecções fúngicas sistêmicas, com amplo espectro de ação. Não é metabolizada pelas enzimas do citocromo P450 e não apresenta casos de interação medicamentosa, porém são relatadas toxicidades renal e hepática (NETT e ANDES, 2016; PERLIN, RAUTEMAA-RICHARDSON e ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017), além da nefrotoxicidade (ROBBINS, WRIGHT e COWEN, 2016). Já para a nistatina, a administração deve ocorrer apenas por via tópica para o tratamento de infecções superficiais por *Candida* spp., devido a sua elevada toxicidade (BROOKS et al., 2012; CANESCHI, 2018).

Em relação aos fármacos azólicos, quimicamente são divididos em imidazóis (dois átomos de nitrogênio no anel azólico), como o cetoconazol, clotrimazol e miconazol, e os triazóis, como por exemplo, o fluconazol, itraconazol, variconazol e posaconazol (NETT e ANDES, 2016; TANG e WANG, 2018). Eles atuam na biossíntese do ergosterol, inibindo a enzima 14- α -demetilase, responsável pela remoção oxidativa do grupo 14- α -metil do lanosterol, e que está presente no citocromo P450 (CANESCHI, 2018; DELARZE e SANGLARD, 2015). Por serem inibidores muito potentes do sistema citocromo P450, são relativamente contraindicados com alguns inibidores de protease do HIV. Como a absorção dos fármacos dependem do pH ácido, também há preocupações de que a absorção sistêmica possa ser inadequada em pacientes que recebam terapia supressora de ácido ou hipocloridria relacionada à Síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (VAZQUEZ, 2010). Os azólicos ocasionam danos na estrutura e função da membrana celular, o que resulta na inibição do crescimento e alterações morfológicas (TATSUMI et al., 2013). São tipicamente fungistáticos, o que impõe uma forte seleção direcional para a evolução da resistência fúngica (ROBBINS, WRIGHT e COWEN, 2016). De acordo com Zhou e colaboradores (2018), o itraconazol tem um espectro de atividade maior do que o fluconazol. O cetoconazol não é mais amplamente prescrito, uma vez que gera reações adversas potencialmente graves, incluindo hepatotoxicidade, além de baixa biodisponibilidade bucal e uma série de interações com outros fármacos.

A administração de anfotericina B e das equinocandinas por via intravenosa é também eficaz. O voriconazol e o posaconazol não devem ser usados no tratamento de casos iniciais ou leves de candidíase orofaríngea. Apenas em situações específicas, como candidíase causada por *C. krusei* ou em episódios de resistência ao fluconazol, o uso de antifúngicos de segunda linha deve ser implementado (BENSADOUN et al., 2011).

As estatinas mostraram-se benéficas nos desfechos de pacientes com candidemia. No entanto, os efeitos da combinação de estatinas e azóis contra patógenos fúngicos são complexos, devido às variedades estruturais. As habilidades das estatinas contra fungos dependem da via de biossíntese do ergosterol (ZHOU et al., 2018).

Por sua vez, as equinocandinas são uma boa opção terapêutica para o tratamento da candidíase invasiva, sendo a terapia de primeira escolha para a candidemia, apesar de seu custo mais elevado em relação às outras classes de antifúngicos e da ausência de formulação oral. Possuem efeito fungicida contra a maioria das espécies de *Candida* spp., não promovem efeitos adversos relevantes, além de não serem relatadas interações com

outros fármacos. Atuam interferindo na síntese da parede de células fúngicas, através da inibição não competitiva da enzima necessária para a síntese do glucano (complexo de 1,3-glucano sintase), o que resulta em um enfraquecimento da parede celular (ALEXANDER et al., 2013-b; FORASTIERO et al., 2015; ROBBINS, WRIGHT e COWEN, 2016).

Nos últimos anos, foram relatadas falhas no tratamento em pacientes com diferentes tipos clínicos de candidíase. O consumo a longo prazo de antifúngicos causou efeitos adversos e resistência por parte dos micro-organismos a esses medicamentos, limitando o uso dessas terapias (AGHAZADEH et al., 2016; BERMAN e KRYSAN, 2020; CANESCHI et al., 2020; ESPINEL-INGROFF, CANTÓN e PEMÁN, 2021; HOUST, SPIZEK e HAVLICEK, 2020; SOARES et al., 2018-a; SOARES et al., 2018-b). Ainda, há uma escassez de alvos específicos dos antifúngicos, o que é um problema, devido à prevalência de resistência cruzada de diversos medicamentos dessa classe, já que a maioria desses fármacos tem como alvo o ergosterol; a biossíntese de ergosterol; ou a biossíntese de (1,3) β -D-glucano, o componente principal da parede celular fúngica (ROBBINS, WRIGHT e COWEN, 2016).

Os mecanismos mais conhecidos de resistência pelos fármacos azólicos incluem a superexpressão do alvo da droga ou bombas de fluxo de sangue, mutações nas vias alvo e alterações na parede celular ou membrana plasmática (BERMAN e KRYSAN, 2020; PFALLER, 2012; TONON et al., 2018). Morace, Perdoni e Borghi (2014) e Monteiro e colaboradores (2015) ressaltaram ainda a formação de um biofilme pelas espécies de *Candida* spp., o qual funciona como uma barreira a entrada de antifúngicos, representando um grave problema no contexto da falha terapêutica. Em relação à resistência aos polienos, algumas teorias incluem a diminuição do acesso ao alvo do medicamento devido a alterações do conteúdo de ergosterol na membrana; ao acúmulo de outros esteróis; e aumento da atividade da catalase, levando a uma redução no dano oxidativo (PFALLER, 2012). Quanto à resistência às equinocandinas, acredita-se que ocorram mutações pontuais, resultando na modificação do alvo (PFALLER, 2012). Segundo Berman e Krysan (2020), ela é quase exclusivamente devido a mutações nos genes que codificam a enzima alvo da droga (1,3- β -glucano sintase), sendo bem menos prevalente do que a resistência aos azóis.

Destaca-se também que a maioria dos agentes antifúngicos apresentam efeitos tóxicos, como náuseas, vômitos, disfunção hepática, arritmias e neuropatias, além de

apresentarem baixa biodisponibilidade e absorção intestinal (SILVA-ROCHA et al., 2015), o que justifica a importância de pesquisas em busca de novos agentes terapêuticos seguros, eficazes e de origem natural (AGHAZADEH et al., 2016; CANESCHI et al., 2020; FIORINI et al., 2016; MORAIS-BRAGA et al., 2016; SILVA-ROCHA et al., 2015; SOARES et al., 2018-a; SOARES et al., 2018-b; TOREY et al., 2016; ZHOU et al., 2018). Dentro dessa dialética, sabe-se que é mais difícil alcançar a toxicidade seletiva nas células fúngicas do que nas células bacterianas, isso devido ao fato de os fungos serem organismos eucariontes e sua estrutura celular ser próxima a dos animais. Assim, os agentes antifúngicos afetam as vias metabólicas desses micro-organismos e frequentemente as vias correspondentes das células hospedeiras, tornando-os tóxicos (ESPINEL-INGROFF, 2009).

Diversos são os problemas dos antifúngicos disponíveis, os quais estão relacionados ao espectro, potência, segurança, propriedades físico-químicas, biofarmacêuticas, farmacocinéticas, farmacodinâmicas e interações medicamentosas (PFALLER, 2012; SOLIMAN, 2017). Além disso, há uma tendência de aumento na incidência das infecções fúngicas, surgimento de resistência frente às opções comercialmente disponíveis e conseqüentemente o aumento na mortalidade populacional relacionada (CANESCHI et al., 2020; PFALLER, 2012; SOARES et al., 2018-a; SOARES et al., 2018-b). Tais fatos justificam a necessidade do desenvolvimento de novas substâncias ativas antifúngicas que ofereçam um tratamento seguro e eficaz (LUDWIG et al., 2019; PFALLER, 2012; TONON et al., 2018). No entanto, os investimentos para o desenvolvimento desses fármacos são reduzidos, o que pode ser justificado pela expectativa de retorno financeiro limitado para as empresas farmacêuticas (ROBBINS, WRIGHT e COWEN, 2016). Assim, relações entre a academia e a indústria são importantes para acelerar esse processo inventivo de medicamentos antifúngicos inovadores (ROBBINS, WRIGHT e COWEN, 2016). Nesse sentido, modalidades terapêuticas alternativas, como a utilização de derivados de espécies vegetais, têm despertado interesse científico e preenchendo nichos de mercado, por representarem uma possibilidade viável e eficiente (CORRÊA, 2018).

2.1.2.1 Fitoterapia

A fitoterapia é definida como a aplicação terapêutica de plantas ou parte de plantas (flor, folha, caule, raiz) ou extratos vegetais (LACCOURREYE et al., 2017). A primeira referência a essa forma de terapia foi encontrada na China, nos escritos do imperador Cho

Chin Ken, por volta de 3.000 a.C. No Brasil, os povos indígenas já usavam plantas para o tratamento de doenças e a chegada de africanos e jesuítas europeus agregaram ainda mais conhecimentos (LOPES et al., 2018). Inicialmente, essa prática se baseava na cultura popular, que era transmitida de geração em geração (LOPES et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2015). Apesar do grande número de medicamentos sintéticos desenvolvidos, as plantas medicinais ainda são utilizadas, o que pode ser explicado pelos maiores custos de medicamentos alopáticos e um acesso limitado da população a eles, especialmente em países em desenvolvimento (OLIVEIRA et al., 2015). A Organização Mundial da Saúde considera os fitoterápicos importantes instrumentos da assistência farmacêutica e ressalta a necessidade de valorizar a sua utilização, ao estimar que 70% a 90% da população desses países dependem deles, no que se refere à Atenção Primária à Saúde (WHO, 2011).

Ao serem comparadas com os medicamentos sintéticos, as plantas medicinais podem minimizar a ocorrência de resistência microbiana. Além disso, algumas espécies apresentam características de biodegradabilidade e baixa toxicidade, o que as tornam produtos desejáveis no mercado (NIKOLIC et al., 2017). Nesse contexto, o alto índice de casos de resistência de micro-organismos patogênicos tem chamado a atenção para os extratos vegetais, como uma possível nova fonte de agentes com atividade antifúngica (MOHAMMED, DHADED e JOSHI, 2016).

As plantas, especialmente os metabólitos secundários, como os presentes nos óleos essenciais, são bem conhecidos por suas propriedades biológicas de amplo espectro (antimicrobiana, antioxidante, antitumoral, inseticida) e diversas aplicações nas indústrias farmacêutica, alimentícia e de cosméticos (ELMI et al., 2019; KONG et al., 2019; NIKOLIC et al., 2017; RAMADAN et al., 2019).

Em 2006, foi criada no Brasil a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, a qual propiciou a implantação da fitoterapia no Sistema Único de Saúde (SUS), o que representou, além da incorporação de mais uma possibilidade terapêutica à disposição dos profissionais de saúde, o resgate de uma prática milenar, que combina os conhecimentos científico e o popular (FIGUEREDO, GURGEL e GURGEL JUNIOR, 2014; KLEIN et al., 2009; LUCAS et al., 2019; SANTOS et al., 2011). Tal política estimula o avanço na comprovação científica da eficácia e da segurança das plantas medicinais e dos fitoterápicos, o aumento do número de pessoas que buscam formas alternativas de tratamento, o uso sustentável da biodiversidade e o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional, ampliando as opções terapêuticas e a melhoria

da atenção à saúde aos usuários do SUS (BRASIL, 2009; FIGUEREDO, GURGEL e GURGEL JUNIOR, 2014; DUTRA et al., 2016; LUCAS et al., 2019; MOHAMMED, DHADED e JOSHI, 2016; OLIVEIRA et al., 2015). Outro importante programa que institui a fitoterapia no SUS é a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares, que visa a prevenção, promoção e recuperação da saúde, garante qualidade, eficácia, eficiência e segurança quanto ao uso das práticas complementares, além de encorajar e divulgar possíveis terapias alternativas para o tratamento de doenças. Dentre as práticas complementares, estão a fitoterapia, a acupuntura, a homeopatia, a antroposofia e a crenoterapia (BRASIL, 2006).

A fitoterapia é ofertada em 1.108 municípios brasileiros, segundo dados de 2017 do Sistema de Informação em Saúde para a Atenção Básica (BRASIL, 2017), sendo disponibilizados doze medicamentos fitoterápicos, os quais constam na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais e são indicados para o tratamento de diversas patologias (uso ginecológico, artrite, osteoartrite, tratamento de queimaduras e auxiliares terapêuticos de gastrite e úlcera) (BRASIL, 2019).

Em 2018 foi publicado pela Anvisa o primeiro suplemento do “Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira”, ampliando o número de formulações presentes no formulário publicado anteriormente em 2011. As formulações relacionadas nesse formulário são reconhecidas como oficiais ou farmacopeicas, servindo como referência para o sistema de notificação de Produtos Tradicionais Fitoterápicos da Anvisa, podendo, ainda, ser manipuladas de modo a se estabelecer um estoque mínimo em farmácias de manipulação e farmácias vivas (ANVISA, 2018).

Extensas são as potencialidades de utilização de plantas medicinais e essas encontram-se longe de estarem esgotadas. Das 250 mil espécies de plantas medicinais, apenas 1% são usadas como matérias-primas vegetais, ressaltando o enorme potencial de expansão deste mercado (ASSIS et al., 2015). Minimamente 25% de todos os fármacos são derivados direta ou indiretamente de plantas, principalmente por meio da aplicação de tecnologia moderna aos conhecimentos tradicionais (ASSIS et al., 2015; WHO, 2011). Essa porcentagem é mais elevada quando se refere aos antitumorais e antimicrobianos, com índices em torno de 60% (WHO, 2011). Dentro dessa dialética, ressalta-se que os produtos naturais, sejam substâncias isoladas, extratos vegetais ou óleos essenciais, podem fornecer oportunidades ilimitadas para o desenvolvimento de novos medicamentos, já que possuem extensa diversidade química (ASSIS et al., 2015).

Ressalta-se, ainda, que uma crescente demanda mundial de um mercado consumidor adepto à compra de produtos elaborados com base em ativos naturais, na busca de hábitos mais saudáveis de vida e a valorização do meio ambiente através do consumo desses produtos (ASSIS et al., 2015, MIGUEL, 2011). Essa tendência, associada ao alto custo de alguns medicamentos alopáticos, desencadeou um aumento progressivo da produção e utilização de produtos naturais, especialmente os de origem vegetal (ASSIS et al., 2015; MONTES et al., 2017). O grande impulsionador deste mercado é o fato de as pessoas acreditarem nas vantagens dos mesmos sobre os produtos sintéticos (ANTIGNAC et al., 2011; DEEPAK, YOGITA e MEENAKSHI, 2013; MARTINS et al., 2016), sendo que a maior parte desses indivíduos são os que apresentam maior preocupação com sua saúde (LOPES et al., 2018).

É justamente nesse contexto que o desenvolvimento de fitoterápicos se apresenta como um nicho forte de mercado tanto em nível nacional quanto internacional (MACEDO e GEMAL, 2009). Eles representam uma taxa significativa do mercado mundial de medicamentos. Cerca de 70-90% da população em países em desenvolvimento utilizam a fitoterapia; nos EUA, aproximadamente 20%; e 10-20% na Europa (LACCOURREYE et al., 2017). O mercado internacional atinge um crescimento médio anual em torno de 15%; em contrapartida, os produtos sintéticos crescem 4% ao ano (RODRIGUES, 2016). No Brasil, entre 2013 e 2015, a busca por tratamentos à base de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos pelo SUS atingiu uma elevação de 161% (BRASIL, 2018). Buscando esse mercado em expansão, as indústrias estão desenvolvendo produtos inovadores que contenham princípios ativos de origem natural (LUCAS et al., 2019; POLONINI, 2011; MONTES et al., 2017).

2.1.2.1.1 *Melaleuca alternifolia*

A *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) (Figura 5) é uma espécie vegetal originária da Austrália, que vem sendo empregada com fins terapêuticos a mais de 80 anos. Inicialmente, os aborígenes utilizavam as folhas (por via inalatória) para tratar a tosse e o resfriado, ou faziam seu uso tópico, no caso de infecções cutâneas, como inseticida, antisséptico ou desinfetante (CRAWFORD et al., 2004; RAMADAN et al., 2019; SHARIFI-RAD et al., 2017; SILVA et al., 2019).

Essa espécie vegetal é caracterizada por arbustos altos ou pequenas árvores com altura de até 7 metros e com uma copa espessa. As folhas atingem de 10-35 milímetros

de comprimento e 1 milímetro de largura, não têm pelos e possuem glândulas proeminentes enriquecidas com óleo aromático. Podem ser cultivadas em climas subtropicais, mas possuem preferência por solos úmidos e com a presença de sol, sendo seu habitat de melhor desenvolvimento as regiões costeiras (pântanos). São bastante resistentes e podem crescer em diversas condições ambientais, tolerando bem as secas, as inundações, incêndios, os solos ácido e salino, mas não suportam temperaturas extremamente baixas. Tendem a ter melhor crescimento em ambientes com pH maiores que 7, porém na Austrália, seu local de origem, o solo tem pH menor ou próximo a 6. Seu cultivo é rentável, sendo que no momento da colheita (por volta de 6-18 meses) a planta inteira é coletada para a extração do óleo essencial (SHARIFI-RAD et al., 2017).



Figura 5: *Melaleuca alternifolia*. Fonte: Ucker (2016).

Existem seis quimiotipos de *Melaleuca alternifolia* de ocorrência natural, cada um produzindo óleo com composição química distinta (BRUN et al., 2019). O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (OM), também conhecido como *tea tree oil*, pode ser extraído por meio da destilação por arraste a vapor (COMIN et al., 2016; LI et al., 2016). O cultivo e a extração do OM se estenderam além dos limites do território australiano, para países da Europa, Brasil e América do Norte, com destaque para os EUA (BRUN et al., 2019; CARSON et al., 2006; UCKER, 2016). Devido à variabilidade inerente de quimiotipos, diferenças na preparação, variações nos períodos de armazenamento e oscilações lote-a-lote, diversos níveis de eficácia antimicrobiana foram relatados para os óleos comercialmente disponíveis (BRUN et al., 2019; LI et al., 2016). Para alguns pesquisadores (SHARIFI-RAD et al., 2017; SOUZA et al., 2019; ELMÍ et al., 2019 e

ZHANG et al., 2018), a modificação da composição do OM está ligada a fatores como clima, local de colheita, tipo de cultura, época do ano, idade das folhas, forma de maceração e duração da destilação.

A constituição química do OM combina mono e sesquiterpenos e seus álcoois correspondentes, com mais de 100 componentes químicos isolados. A identificação e a quantificação desses constituintes, geralmente, são realizadas por cromatografia gasosa (ELMI et al., 2019; FELIPE et al., 2017; WONG et al., 2015).

Os parâmetros físico-químicos são regulamentados por um padrão internacional (ISO 4730:2017), o qual especifica as concentrações mínimas e/ou máximas de seus 14 componentes majoritários, dos quais o terpinen-4-ol, α e γ -terpineno, 1,8-cineol, α -terpineol e terpinoleno correspondem a mais de 90% do total dos constituintes do OM (BRUN et al., 2019; HAMMER, 2015).

O terpinen-4-ol, é o componente presente em maior quantidade e é o responsável pelas atividades antimicrobiana, antifúngica, anti-inflamatória e antitumoral (ANGELIERI, 2013; NOGUEIRA et al., 2014; OLIVA et al., 2018; RASTEIRO et al., 2014). Segundo Brun e colaboradores (2019), de 30 a 40% da ação antimicrobiana é atribuída ao conteúdo desse terpeno. Para outros autores (BRUN et al., 2019; FELIPE et al., 2017 e NIKOLIC et al., 2017), apesar dessa atividade estar principalmente ligada ao terpinen-4-ol, outros constituintes também podem contribuir para a ação global do OM, mostrando sinergismo entre os componentes da planta.

De acordo com a ISO 4730:2017, o OM deve conter, no mínimo, 35% de terpinen-4-ol e no máximo 15% de 1,8-cineol. Para Souza e colaboradores (2017-b), o 1,8-cineol possui ação broncodilatadora, expectorante e antisséptica, entre outras, ressaltando a importância do nível do mesmo, pois relatos na literatura científica o associam como o principal causador de alergenicidade relacionados ao uso tópico do OM. Outros estudos discordaram dessa informação e apontam uma relação entre a ocorrência de efeitos tóxicos e a degradação oxidativa do óleo exposto ao ar e/ou à luz (HAMMER et al., 2006). Além disso, é descrito que esse componente pode aumentar a permeabilidade da membrana dos micro-organismos, facilitando a entrada de outros agentes antimicrobianos, sendo, portanto, o detentor de efeito antimicrobiano marginal (BRUN et al., 2019; HAMMER et al., 2003). Nesse contexto, Carson e colaboradores (1995) sugerem que as divergências encontradas na literatura científica sobre o OM podem ser explicadas pelas diferenças metodológicas.

O OM apresenta uma vasta quantidade de atividades terapêuticas, que incluem: ação antifúngica (BRUN et al., 2019; COMIN et al., 2016; FELIPE et al., 2018; LI et al., 2016; PIEKARZ et al., 2017; SHARIFI-RAD et al., 2017; SOUZA et al., 2019; YU et al., 2015); antibacteriana (tanto para bactérias Gram-positivas, como para Gram-negativas) (BRUN et al., 2019; COMIN et al., 2016; LI et al., 2016; NOUMI et al., 2018; OLIVA et al., 2018; PAZYAR et al., 2013; SOUZA et al., 2019; UCKER, 2016); antiviral (BRUN et al., 2019; LI et al., 2013); antiprotozoária (BRUN et al., 2019; GRANDO et al., 2016; LI et al., 2016; LIU et al., 2009); antioxidante (ASSMANN et al., 2018; SOUZA et al., 2019; ; UCKER, 2016; ZHANG et al., 2018); anti-inflamatória (ASSMANN et al., 2018; MORSOLETO et al., 2015; NOUMI et al., 2018); analgésica (CARSON et al., 2006; LIU et al., 2009; PIEKARZ et al., 2017), antitumoral (ASSMANN et al., 2018; LIU et al., 2009; RAMADAN et al., 2019), inseticida (SHARIFI-RAD et al., 2017) e de cicatrização (ASSMANN et al., 2018; KONG et al., 2019; PIEKARZ et al., 2017; SHARIFI-RAD et al., 2017). Brun e colaboradores (2019) ressaltaram a eficácia do OM no tratamento de infecções da pele e das mucosas, incluindo acne, herpes labial e candidíase bucal com poucos efeitos colaterais aparentes.

Especificamente em relação ao uso do OM com finalidade antifúngica, destaca-se a utilização para o tratamento dos diversos tipos de *Candida* spp. (SUDJANA et al., 2012; MERTAS et al., 2015; RASTEIRO et al., 2014). Quanto ao mecanismo de ação do OM frente aos fungos, Brun e colaboradores (2019) sugeriram que componentes do óleo essencial ocasionam a ruptura da membrana mitocondrial, aumentando significativamente os níveis de espécies reativas de oxigênio. Para Felipe e colaboradores (2018) e Flores e colaboradores (2013), a atividade antimicrobiana do OM está associada à alteração gerada na membrana celular da levedura, uma vez que ocorre uma reação de hidrofobicidade dos terpenos do óleo e os lipídios da membrana celular do patógeno. Comin e colaboradores (2016) demonstraram que a ação do OM em fungos está ligada à desnaturação proteica, alterando as propriedades e a função da membrana da parede celular, causando perda de componentes intracelulares, resultando em morte celular.

Souza e colaboradores (2017-a e 2017-b) relataram alguns problemas referentes ao OM, quanto às propriedades físicas, como a reduzida miscibilidade em água e altas taxas de volatilização, resultando em baixa estabilidade. Além disso, segundo esses autores e Ramage e colaboradores (2012), o OM é capaz de induzir reações alérgicas quando aplicado topicamente, devido à oxidação dos constituintes, de acordo com as condições

de armazenamento. Salientaram, ainda, sua pobre palatabilidade quando utilizado em preparações orais. Nesse sentido, o desenvolvimento de carreadores nanoestruturados para a encapsulação do referido óleo poderia contribuir para o incremento da aceitação, estabilidade e segurança desse bioativo (RAMAGE et al., 2012).

2.1.2.1.2 Terpinen-4-ol

O terpinen-4-ol (Figura 6) é um monoterpreno (TONON et al., 2018), derivado do metabolismo secundário de algumas plantas (ANGELIERI, 2013; MACCARI, 2011). É o principal componente do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, mas também pode ser produzido por outros vegetais dos gêneros: *Alpinia*, *Camellia*; *Eucalyptus*; *Laurus*; *Artemisia*; *Cinnamo*; *Citrus*; *Cuminum*; *Cupressus*; *Cymbopogon*; *Lantana*; *Lippia*; *Myrsifca*; *Origanum*; *Pimpinella*; *Rosmarinus*; *Salvia* e *Thymus* (BETTONI, 2004; NASCIMENTO et al., 2005; PRIEST e PRIEST, 2002; VIEIRA et al., 2004).

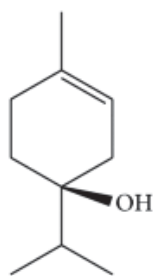


Figura 6: Estrutura química do terpinen-4-ol. Fonte: Nóbrega e colaboradores (2014).

Esse terpeno possui atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e antitumoral (ANGELIERI, 2013; NOGUEIRA et al., 2014). Por serem moléculas hidrofóbicas, podem se ligar às estruturas lipofílicas de micro-organismos, como a membrana plasmática, o que leva ao aumento da permeabilidade e perda de eletrólitos essenciais para a sobrevivência celular (GRANDO et al., 2016; TONON et al., 2018).

Pode ter sua aplicação limitada na área farmacêutica, já que é um composto volátil (SUN et al., 2012). No entanto, a encapsulação deste componente em sistemas coloidais pode favorecer a liberação controlada, assim como propiciar proteção e diminuição da volatilização (ANGELIERI, 2013).

No tratamento da candidíase orofaríngea, o terpinen-4-ol pode agir em duas frentes. Por meio da atividade antifúngica e também da ação anti-inflamatória, através da estimulação da migração de neutrófilos, minimizando os sintomas (NINOMIYA et al.,

2013). Em 2014, Nogueira e colaboradores demonstraram que os efeitos inibitórios sobre a resposta inflamatória estão ligados principalmente à redução da vasodilatação e do extravasamento plasmático.

A utilização do terpinen-4-ol isolado apresenta vantagens sobre o óleo essencial em termos de segurança e consistência do produto. Esse ativo puro pode excluir os efeitos deletérios causados pelos outros terpenos que compõem o OM. Evidências sugerem que seu uso tópico é seguro e que os efeitos adversos são pequenos e pouco frequentes. Porém, ainda há a necessidade de se investigar os benefícios medicinais do terpinen-4-ol em comparação com o OM (RAMAGE et al., 2012; TONON et al., 2018).

2.2 NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia é uma das grandes inovações do século XXI. Materiais nanométricos têm sido utilizados em diversos setores industriais e a estimativa é que sejam explorados na biotecnologia, medicina e indústria farmacêutica, oferecendo uma série de vantagens (LESO, FONTANA e IAVICOLI, 2019; MUNK et al., 2016). Essa tecnologia, segundo definição da ISO/TC 229, se baseia na produção e na utilização de estruturas que possuam pelo menos uma das dimensões que não excedam 100 nm, fazendo com que os materiais apresentem propriedades diferentes ou não presentes, quando estão em tamanho não nanométrico, como a tolerância à temperatura, a variedade de cores, as alterações da reatividade química e a condutividade elétrica (FERREIRA e RANGEL, 2009; OLIVEIRA et al., 2011).

Algumas das vantagens das nanopartículas (NPs) geralmente incluem: o aumento da estabilidade; a melhora da solubilidade; a redução da toxicidade, já que evitam a flutuação de níveis plasmáticos do ativo administrado; a elevação da biodisponibilidade, uma vez que auxiliam na incorporação tanto de substâncias hidrofílicas quanto de lipofílicas, além do favorecimento da liberação sítio-específica e controlada dos ativos encapsulados, o que pode aumentar a eficácia terapêutica (FLORES et al., 2013; LAUTERBACH e MÜLLER-GOYMANN, 2015; PANDEY et al., 2013; RIZWANULLA et al., 2017; SOUZA et al., 2017-a ; SOUZA et al., 2017-b; WANG et al., 2009).

Existem, atualmente, diversos tipos de NPs (Figura 7) constituídas de polímeros, lipídios, fosfolipídios e metais, como os lipossomas, NPs poliméricas, nanocarreadores

lipídicos, nanoemulsões, NPs metálicas e as nanopartículas lipídicas sólidas (GE e GE, 2015; RIZWANULLA et al., 2017).

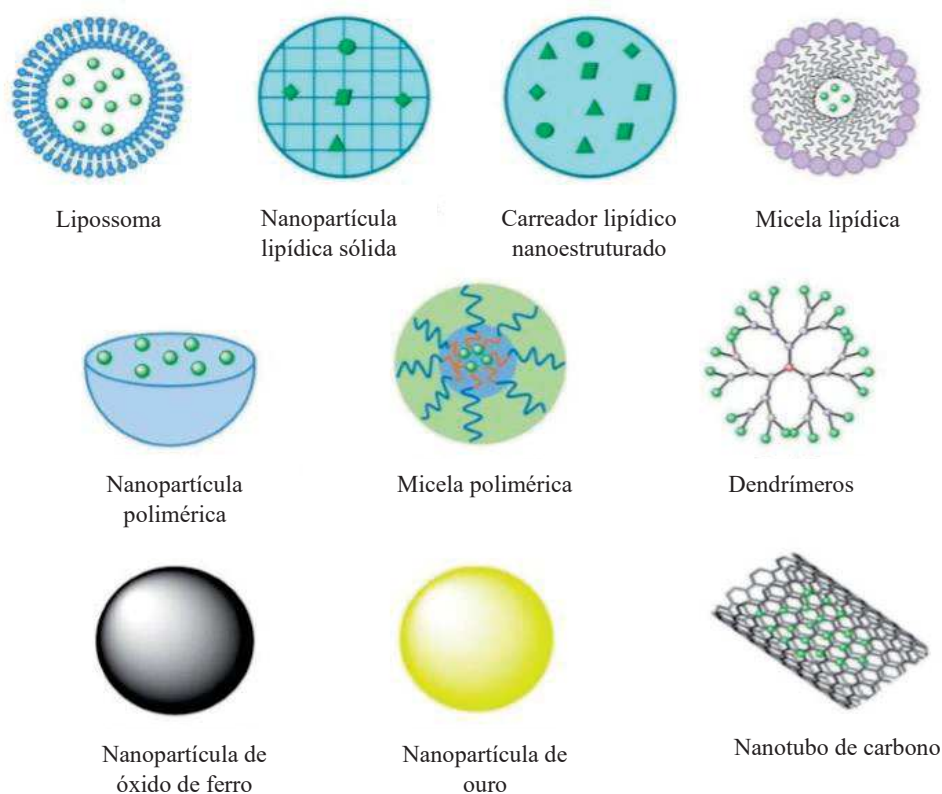


Figura 7: Ilustração esquemática de diferentes sistemas nanoparticulados. Fonte: Rizwanullah et al. (2017).

As NPs que utilizam lipídios possuem como diferença principal a temperatura do lipídio: nanoemulsões (lipídio líquido em temperatura ambiente); nanocarreadores lipídicos (lipídio líquido e sólido); e as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) (lipídio sólido em temperatura ambiente) (WISSING, KAYSER e MÜLLER, 2004).

Visando driblar problemas da terapia antifúngica convencional, a nanotecnologia surge tentando promover progressos (KANAPARTHY e KANAPARTHY, 2011). Especificamente em relação ao óleo de *Melaleuca alternifolia*, Ge e Ge (2015) demonstraram que carreadores nanométricos são capazes de incrementar os parâmetros de estabilidade, eficácia e segurança. Souza e colaboradores (2017-a e 2017-b) revelaram que as nanopartículas de OM podem solucionar problemas como instabilidade do óleo e também propiciar o aumento dos efeitos antimicrobianos contra muitos microorganismos, incluindo espécies de *Candida* spp. Para Baldissera e colaboradores (2014), a nanoestruturação do referido óleo tem sido utilizada para melhorar a eficiência, usando volumes reduzidos, o que é possível pela manipulação de moléculas pra formar uma nova

organização estrutural dos átomos. Em 2016, Comin e colaboradores apontaram que as nanopartículas podem aumentar o potencial antimicrobiano do OM, além de elevar a estabilidade físico-química e proteger contra a evaporação do óleo. E ainda, Grandó e colaboradores (2016) anunciaram que a nanotecnologia aplicada tanto ao OM quanto do terpinen-4-ol aumenta a eficácia e a biodisponibilidade destas substâncias.

A encapsulação de fármacos com baixa solubilidade em meio aquoso, como o terpinen-4-ol, em sistemas coloidais, tem sido uma das grandes estratégias atuais, o que evita a degradação do ativo quando em contato com os fluidos biológicos, além de promover a possibilidade de controlar a liberação e alterar a biodistribuição dos mesmos, permitindo que os órgãos e tecidos alvos sejam atingidos (ANGELIERI, 2013).

É importante mencionar, ainda, que os sistemas nanoestruturados apresentam uma melhor aderência, por possuírem maior área de superfície, podendo então permanecer na área-alvo por um longo período de tempo (LIMA et al., 2017).

2.2.1 Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS)

As NLS são preparadas através da substituição do lipídio líquido (óleo) de emulsões óleo/água (O/A) por um lipídio ou mistura de lipídios sólidos e, posteriormente, estabilizadas por um tensoativo (ANGELIERI, 2013; MÜLLER, MÄDER e GOHLA, 2000; SOUTO et al., 2011). O lipídio na forma sólida confere menor mobilidade aos ativos nele incorporado, podendo sustentar ou até controlar a velocidade de liberação destas substâncias (MÄDER e MEHNERT, 2001).

Os lipídios usados na produção das NLS são os glicerídios (tri e monoestearato de glicerila), ácidos graxos de elevado ponto de fusão, como o esteárico e o palmítico, esteróis (colesterol) e ceras (palmitato de cetila) (MÜLLER, MÄDER e GOHLA, 2000; MÜLLER et al., 2007). O ideal são as misturas de ácidos graxos com diferentes pontos de fusão, pois formam estruturas com muitas imperfeições, originando NLS com maior capacidade para incorporar as substâncias ativas (SOUTO et al., 2011), já que os fármacos se localizam entre as cadeias lipídicas e nas imperfeições dos cristais. Portanto, a alta organização dos cristais, como nos triacilgliceróis, gera poucos locais para acomodar os princípios ativos, induzindo sua expulsão da matriz lipídica sólida, o que diminui a eficiência de encapsulação (MÜLLER, MÄDER e GOHLA, 2000; MÜLLER et al., 2007).

As NLS possuem diversas vantagens se comparadas aos outros tipos de NPs, como: maior estabilidade do sistema em longo prazo; melhor perfil de liberação controlada, pois a mobilidade do fármaco na matriz sólida é menor em relação ao óleo líquido; não necessita de solventes orgânicos para a fabricação; métodos de produção acessíveis; esterilização facilitada; e por possuírem uma matriz sólida, são capazes de incorporar o fármaco, tanto de caráter lipofílico quanto hidrofílico (ANGELIERI, 2013; DETONI et al., 2012; GARCÊS et al., 2018; KALAYCIOGLU e AYDOGAN, 2016; KUMAR e RANDHAWA, 2013; MADER e MEHNERT, 2001; PERES et al., 2016; YANG et al., 2014).

Para evitar a agregação e manter a estabilidade das NLS, tensoativos são adicionados ao sistema. Os mais empregados são os sais biliares (taurodeoxicolato), lecitinas e copolímeros do polióxidoetileno (PEO) e polióxidopropileno (PPO) (poloxamer) (MÄDER e MEHNERT, 2001; WONG et al., 2007). Destacam-se entre eles, os poloxâmeros (Pluronic®), sendo o Pluronic® F-127 o mais utilizado, devido ao seu potencial para aplicação na área biomédica (ALEXANDER et al., 2013-a; KABANOV, BATRAKOVA e ALAKHOV, 2002). Quando em solvente aquoso, o Pluronic® F-127, em razão da relativa diferença de hidrofobicidade entre os monômeros, forma estrutura micelar, sendo que a porção de PPO funciona como o núcleo hidrofóbico para a incorporação de ativos lipofílicos, enquanto a porção PEO previne a adsorção e agregação das NPs (ALMEIDA et al., 2012).

2.3 FORMAS FARMACÊUTICAS

Diversas são as formas farmacêuticas disponíveis para a administração de fármacos: cápsulas; comprimidos; injetáveis; supositórios; pomadas; aerossóis; adesivos; hidrogéis; loções; cremes; géis-cremes; emplastos; unguentos (ALLEN JR, POPOVICH e ANSEL, 2013; ALLEVATO, 2007; SANTOS, 2012). Cada uma dessas formas deve conter uma quantidade específica dos insumos farmacêuticos ativos para propiciar a dose adequada (ALLEN JR, POPOVICH e ANSEL, 2013). A forma farmacêutica empregada neste trabalho foi o hidrogel.

2.3.1 Hidrogéis

Os hidrogéis são formas farmacêuticas constituídas por pequenas quantidades de sólidos (agente geleificante) que dispersos em grandes volumes de líquido, formam uma estrutura coloidal tridimensional, a qual é responsável pela consistência semissólida e aparência transparente ou translúcida. Algumas das vantagens desse tipo de forma farmacêutica são: a segurança; a versatilidade; o baixo custo; a facilidade de aplicação e o sensorial agradável (SANTOS, 2012).

Um dos polímeros geleificantes bastante utilizado é o Pemulen[®], devido à facilidade de preparação de hidrogéis, ao pequeno potencial de irritação e à capacidade mucoadesiva. São copolímeros reticulados de ácido acrílico e metacrilatos de cadeia longa (SANTOS, 2012), de alto peso molecular e de caráter aniônico (LIMA et al., 2017). Sua estrutura química é composta por uma pequena porção lipofílica e uma grande porção hidrofílica, o que permite que estes copolímeros funcionem, ainda, como emulsionantes primários em emulsões O/A. A porção lipofílica adsorve na interface O/A e porção hidrofílica incha na presença de água, formando uma rede de gel ao redor da gotícula de óleo. Esse mecanismo possibilita a estabilidade da emulsão para uma série de óleos essenciais, tendo a capacidade de emulsionar de 20% a 30% de óleo em peso, dependendo do pH (TEGELI et al., 2011).

O preparo do hidrogel a partir de substâncias mucoadesivas tem sido usado para aumentar o tempo de permanência da formulação *in situ*, mantendo uma alta concentração local de insumo farmacêutico ativo nos tecidos circundantes durante um período prolongado, permitindo a redução do número de aplicações (LIMA et al., 2017; PARENTE et al., 2015). Essa característica pode ser vantajosa para insumos farmacêuticos ativos destinados a ações superficiais, bem como àqueles que deveriam exercer sua ação em camadas mais profundas (PARENTE et al., 2015).

Para ser considerado mucoadesivo, o polímero deve apresentar alto peso molecular; capacidade de controlar a interpenetração entre o polímero e a mucosa, favorecendo a difusão; hidrofília, permitindo uma forte aderência com o muco, que contém grandes quantidades de água; rápida aderência ao tecido e ser específico para a superfície (LIMA et al., 2017).

Com a utilização de um gel mucoadesivo, o processo de bioadesão inicia-se pela interpenetração das moléculas do polímero nas glicoproteínas do muco, sendo a mucina a mais importante, promovendo o primeiro contato. Posteriormente, ocorrem ligações que

estabelecem o processo de bioadesão em si (LYRA et al., 2007; FIGUEIRAS, CARVALHO e VEIGA, 2007).

Nesse sentido, a utilização de um hidrogel mucoadesivo se faz importante para permitir o maior tempo de contato das nanopartículas com a mucosa.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Desenvolver uma plataforma inovadora para o tratamento da candidíase orofaríngea, constituída por um hidrogel mucoadesivo contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (OM) encapsulado em NLS.

3.2 ESPECÍFICOS

- Caracterizar quali e quantitativamente os componentes do OM;
- Desenvolver NLS contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (OM-NLS);
- Caracterizar as nanopartículas obtidas quanto ao tamanho hidrodinâmico médio das partículas, índice de polidispersividade, potencial Zeta, morfologia, eficiência de encapsulação, potencial antioxidante, citotoxicidade *in vitro* em linhagem celular de fibroblastos murinos (L929) e estabilidade;
- Desenvolver um hidrogel contendo OM-NLS e verificar a sua estabilidade em curto prazo;
- Analisar a atividade antifúngica *in vitro* das OM-NLS, bem como do hidrogel desenvolvido;
- Analisar *ex vivo* a permeação bucal do OM presente no hidrogel, utilizando modelo experimental de mucosa bucal suína.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO CROMATOGRÁFICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia*

O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (lote 198), extraído por destilação a vapor das folhas, foi adquirido da empresa Ferquímica Comercial Ltda (São Paulo, Brasil). A caracterização do óleo essencial foi realizada por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM), empregando-se cromatógrafo CG-EM-QP2010 Plus (Shimadzu, Japão) da Central Analítica do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Juiz de Fora. A metodologia de análise foi adaptada de Viccini e colaboradores (2014). Utilizou-se coluna capilar RTX-5MS (5% difenil/95% dimetil polisiloxano - 30 m × 0,25 mm x 0,25 μm) (Restek, Bellefonte, PA, EUA) com gás portador de hélio (1 mL/minuto). A temperatura foi programada para variar de 50 (5 minutos) a 200 °C, com rampa de 4 °C/minuto. As temperaturas do injetor e do detector foram de 200 °C e da interface foi de 220 °C. O óleo foi diluído em hexano grau Cromatografia Gasosa (CG) e 1 μL foi injetado em modo *split* (1:10). A energia de ionização por impacto de elétrons foi de 70 eV. A identificação dos componentes ocorreu com base no índice de retenção (IR) calculado por meio da injeção de padrão de *n*-alcanos C7-C30 e nos modelos de fragmentação dos espectros de massas, sendo ambos comparados ao banco de dados do sistema (NIST08 *Mass Spectral Library*) e com a literatura (ADAMS, 2007).

4.2 DESENVOLVIMENTO DAS NLS

4.2.1 Ensaios preliminares

Inicialmente, foram desenvolvidas e avaliadas NLS contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* empregando percentuais distintos do óleo de interesse (2,5%; 5% e 10%), para fins de estabelecimento de uma concentração ideal de trabalho. Os resultados desta triagem microbiológica revelaram menor dose eficaz e maior espectro de ação com o emprego de OM-NLS 5%. Por questões de custo, operacionais e para otimizar as análises, seguiram-se, então, os estudos apenas com esta condição.

4.2.2 Preparo das NLS

Para o preparo das NLS, optou-se pela técnica de homogeneização por alto cisalhamento (PARDEIK et al., 2009), com modificações. A manteiga de cupuaçu (0,0440 gramas) utilizada como núcleo oleoso, foi aquecida à temperatura de 42 °C em banho-maria, até se fundir. O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel (0,245 mL) foi então adicionado à manteiga (OM-NLS). Para a C-NLS a fase oleosa foi composta apenas pela referida manteiga. Tal manteiga vegetal é composta pelo o ácido oléico (componente majoritário, 41,8%), ácido esteárico (34,4%); ácido araquídico (10,9%); ácido palmítico (7,6%); ácido linoléico (2,4%); ácido palmitoléico (1%); ácido behênico (1%); ácido linolênico (0,3%); e ácido mirístico (0,3%) (SOLDATI, 2015).

A solução de Pluronic[®] F-127 (*Sigma Aldrich Chemistry*, EUA) (0,0308 gramas/4,4 mL de água ultrapurificada) foi aquecida à temperatura de 42 °C e vertida sobre cada fase oleosa. Em seguida, as dispersões formadas foram submetidas à alta agitação (8.000 rotações por minuto - rpm) em Turrax (*SilentCrusher M*, Heidolph, Alemanha) por 1 minuto. Após esse tempo, iniciou-se a irradiação ultrassônica (6 mm de diâmetro, *Vibra Cell*, Sonics, EUA), com a temperatura de 25 °C e amplitude de 30, por 5 minutos. As NLS foram mantidas em geladeira (4 °C) para a solidificação do núcleo lipídico por 24 horas.

Foram preparados dois lotes de C-NLS e OM-NLS, para demonstrar a estabilidade do processo de produção das NLS.

4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NLS

4.3.1 Avaliação do tamanho hidrodinâmico médio das partículas, índice de polidispersividade e potencial Zeta

A caracterização das NLS produzidas foi realizada por meio da análise do tamanho hidrodinâmico médio da partícula (TP), empregando-se a técnica de espalhamento dinâmico de luz (*Zetatrak*, *Microtrac*, EUA). O Índice de polidispersividade (PdI) foi calculado a partir dos resultados de diâmetro hidrodinâmico das partículas, com o intuito de fornecer informações sobre a homogeneidade de tamanho das mesmas.

Foram também caracterizadas através da avaliação da mobilidade eletroforética, transformada em potencial Zeta (PZ) pela equação de Smoluchowski (Equação 1), com o auxílio do dispositivo Zetasizer (*Malvern Instruments*, Reino Unido).

$$\mu = \varepsilon \zeta / \eta \quad (\text{Equação 1})$$

Sendo: μ - mobilidade eletroforética; ε - permissividade elétrica das NLS; ζ -potencial Zeta; e η - viscosidade.

As determinações de TP, PdI e PZ foram realizadas à temperatura de 25 °C, após a diluição apropriada das amostras em água ultrapurificada (1:400, volume/volume - v/v), para evitar interferências nas medidas, devido às características reflexivas das NLS. Os resultados foram obtidos para os dois lotes, tanto para as OM-NLS quanto para as C-NLS e, por meio do cálculo da média de três réplicas. Foram expressos como média \pm desvio padrão. Comparações do TP, PdI e PZ entre C-NLS e OM-NLS foram feitas utilizando teste t de *Student*, por meio do *software* PRISM 5.0 (GraphPad, EUA). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4.3.2 Determinação da eficiência de encapsulação das OM-NLS

A eficiência de encapsulação (EE) foi indiretamente determinada, através do método de ultrafiltração/centrifugação, por meio da quantificação de terpinen-4-ol não encapsulado, presente na fase aquosa.

A suspensão de OM-NLS foi diluída em água ultrapurificada (1:100, v/v). Aliquotas (n=3) de 2 mL foram transferidas para unidades de ultrafiltração (*Amicon*, *MWCO 10.000*, *Millipore*, Alemanha) e centrifugadas (Eppendorf, 5417R, Alemanha) a $1.500 \times g$ por 30 minutos à temperatura ambiente (Figura 8). As amostras foram analisadas com emprego de CG/EM, na Central Analítica do Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora, de acordo com o método descrito no item 4.1.

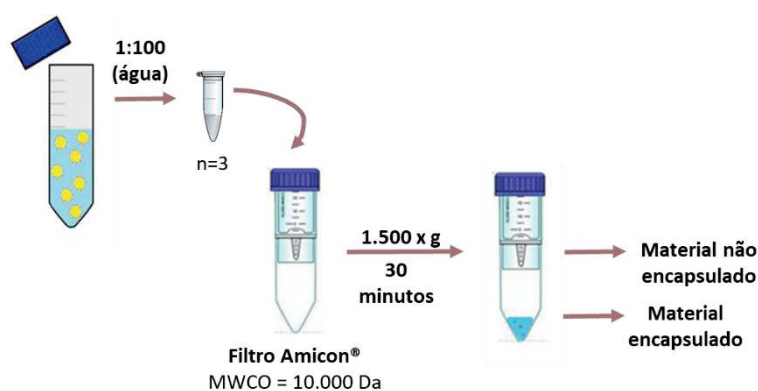


Figura 8: Esquema de ultrafiltração das OM-NLS. Fonte: A autora (2021).

Visando avaliar a qualidade e a pureza do padrão de terpinen-4-ol (95% de pureza, *Sigma Aldrich Chemistry*, EUA), lote BCBS1163V, foi preparada uma solução com 0,14 mg do padrão e 1 mL de hexano grau CG (*SYNTH SP-Labor*, Brasil), obtendo uma concentração 0,14 mg/mL. Essa solução que foi injetada no equipamento de CG/EM, de acordo com as condições descritas anteriormente.

Em seguida, iniciou-se a análise das amostras. Foram adicionados aos frascos, 1 mL das amostras e 500 μ L de hexano grau CG, os quais foram imediatamente tampados. Realizou-se agitação em vórtex (*Genie 2*, *Ciencor*, Brasil) por 30 segundos e em seguida, os frascos foram deixados em repouso até que houvesse a separação das duas fases. Recolheu-se a fase orgânica (superior) com o auxílio de uma pipeta Pasteur. A alíquota recolhida foi filtrada em sistema preparado em pipeta Pasteur (imobilização de um pequeno pedaço de algodão seguido da adição de uma ínfima porção de sulfato de sódio anidro, responsável pela secagem da água residual do extrato em hexano). O extrato limpo foi, então, acondicionado em um frasco de vidro com tampa de teflon. Para análise, foram adicionados 100 μ L do extrato limpo e 300 μ L de hexano grau CG.

Foram injetadas no sistema de CG/EM alíquotas das extrações, nas mesmas condições utilizadas na caracterização do óleo essencial (item 4.1). A quantificação do terpinen-4-ol nas amostras foi realizada com o auxílio da Equação 2.

$$C_{Amostra} = \frac{C_{Padrão} \cdot A_{Amostra}}{A_{Padrão}} \quad (\text{Equação 2})$$

Sendo: $C_{Amostra}$ = concentração de terpinen-4-ol na amostra; $C_{padrão}$ = concentração da solução do padrão de terpinen-4-ol; $A_{Amostra}$ = área do pico correspondente ao terpinen-4-ol presente na amostra; e $A_{padrão}$ = área do pico correspondente ao terpinen-4-ol no padrão.

De posse da concentração de terpinen-4-ol encontrada, calculou-se a EE por meio da Equação 3.

$$EE (\%) = \frac{QTt - QUt}{QTt} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

Sendo: EE = Eficiência de encapsulação; QTt = Quantidade total do terpinen-4-ol adicionado à nanopartícula; e QUt = Quantidade do terpinen-4-ol quantificado no ultrafiltrado.

4.3.3 Avaliação morfológica das NLS

Para avaliação da morfologia das NLS, as suspensões de C-NLS e OM-NLS foram diluídas em água ultrapurificada (1:400, v/v). Uma gota de cada suspensão foi aplicada

sobre o suporte metálico de cobre (300 mesh) com revestimento de carbono e formvar. As partículas foram contrastadas com acetato de uranila e, então, visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão (*MET - JEOL JEM 10-11*, Akishima, Japão), com aumento de até 100.000 vezes, operado em modo de campo brilhante, com voltagem de aceleração de 10 kV. Tais procedimentos foram realizados na Universidade Federal de Santa Catarina.

4.3.4 Determinação da estabilidade das NLS

Após o preparo, as NLS (C-NLS e OM-NLS) foram armazenadas em tubos plásticos cônicos protegidos de luz e mantidos sob refrigeração (4 °C) por 120 dias. A estabilidade físico-química (TP e PdI) foi avaliada nos tempos: 1; 15; 30; 45; 60; 90 e 120 dias após a preparação das mesmas. Para tanto, foram utilizadas as metodologias descritas no item 4.3.1. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Para comparação dos dados entre os diferentes tempos, foi empregada a análise de variância (ANOVA) seguida de teste *post hoc* de Tukey, usando o *software* PRISM 5.0 (GraphPad, EUA). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante das C-NLS, OM-NLS e OM foi avaliada pelo método de sequestro de espécies reativas de oxigênio, através da redução do 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH; *Sigma Aldrich Chemistry*, EUA), descrito por Sreejayan e Rao (1996), com modificações. Uma solução de DPPH foi preparada na concentração de 0,05 mM por meio da pesagem de 1 mg de DPPH, o qual foi solubilizado em 50 mL de etanol absoluto (99,5%) para análise (Cromato Produtos Químicos LTDA, Brasil).

Realizou-se a solubilização de 10 μ L das amostras (C-NLS, OM-NLS e OM) em etanol absoluto (99,5%) para análise, almejando soluções-estoques iniciais de 250 μ g/mL, $12,47 \times 10^{-3}$ μ g/mL e 0,224 μ g/mL respectivamente, a partir das quais sucessivas diluições foram feitas na proporção de 1:2 (v/v), utilizando de etanol absoluto (99,5%) para análise como diluente. Em microplacas de 96 poços, alíquotas de 50 μ L de cada uma das diferentes concentrações das substâncias foram adicionadas a 150 μ L da solução de DPPH. Ao término do processo, foram obtidas, nas placas, concentrações-teste nas faixas respectivas de 250 – 0,122 μ g/mL, $12,47 \times 10^{-3}$ – $5,6 \times 10^{-6}$ μ g/mL e 0,224 – $1,09 \times 10^{-4}$ μ g/mL. Para cada uma das concentrações, o branco da amostra foi preparado com 150 μ L

de etanol absoluto (99,5%) para análise e 50 µL da solução-teste, com a finalidade de excluir possível interferência proveniente da coloração da amostra.

As placas (SI-0400, *Genie Scientific*, EUA) foram agitadas, para que ocorresse a homogeneização das substâncias. Em seguida, elas foram deixadas em repouso, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, por 30 minutos. Passado esse período, a leitura da absorvância foi feita em espectrofotômetro (Multiskan Go-1510, *Thermo Fisher Scientific*, EUA) no comprimento de onda fixo de 510 nm. O resveratrol (98% de pureza; JiAherb, China) foi utilizado como controle positivo. Quanto menor a absorvância maior a atividade antioxidante frente ao DPPH. A atividade antioxidante de todas as concentrações para cada substância foi calculada através da Equação 4:

$$\text{Atividade antioxidante (\%)} = \frac{A_{\text{amostra}} - A_{\text{controle}}}{A_{\text{DPPH}}} \times 100 \text{ (Equação 4)}$$

Sendo: A_{amostra} é o valor da absorvância da solução contendo a amostra mais o DPPH; A_{controle} equivale ao valor da absorvância mais o etanol; e A_{DPPH} equivale à solução etanólica de DPPH.

4.5 CITOTOXICIDADE

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados de acordo com o protocolo descrito por Mosmann (1983) com modificações e utilizando linhagens de fibroblastos murinos (L929). O cultivo das células foi realizado em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Nutricell - Nutrientes celulares, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (*Invitrogen™*, EUA), 1% de antibiótico (10.000 U/mL de penicilina e 10 mg/mL de estreptomina) e tampão 4-(2-HidroxiEtil)-1-PiperazinEtanolSulfônico (HEPES) 10 mM.

Após atingirem 80% de confluência, as células foram tripsinizadas e plaqueadas em microplacas de 96 poços de fundo chato (Kasvi Importação e Distribuição de Produtos Para Laboratórios Ltda, Brasil), na densidade celular de 5×10^3 células/poço, estimada por meio de contagem em câmara de Neubauer empregando o corante azul de trypan (*Sigma Aldrich Chemistry*, EUA), e incubadas em estufa (*Thermo Fisher Scientific*, EUA) a 37 ± 2 °C com 5% de CO₂, pelo período de 24 horas. Passado esse tempo, realizou-se a substituição do meio de cultura pelos tratamentos: OM-NLS (43,5–5568 µg/mL de OM); OM (7,81–1000 µg/mL); C-NLS (7,81–1000 µg/mL). Em seguida, as placas foram reincubadas a 37 ± 2 °C com 5 % de CO₂ por 48 horas. Como controle de meio, utilizaram-

se os poços inoculados sem qualquer tratamento, apenas com o meio de cultura. Como controle de solvente, foi empregado o dimetilsulfóxido a 1% (DMSO) para o óleo essencial e as C-NLS para as OM-NLS.

Após o período de incubação, o meio de cultura foi removido e adicionou-se 10% de brometo 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio] (MTT) (5 mg/mL; 100 µL/poço) em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM). As placas foram imediatamente reincubadas em estufa a 37 ± 2 °C com 5% de CO₂ por 3 horas. Os cristais de formazan produzidos foram dissolvidos com DMSO e a absorvância foi lida em espectrofotômetro (Multiskan Go -1510, *Termo Fisher Scientific*, EUA) no comprimento de onda fixo de 540 nm.

Os resultados foram expressos em porcentagem (%) de viabilidade celular (Equação 5) comparando o controle (células não tratadas) com os tratamentos. A concentração inibitória de 50% (CI₅₀), ou seja, concentração que reduz a viabilidade celular em 50% foi calculada através da elaboração do gráfico de mortalidade celular em função das concentrações, usando o *Microsoft Office Excel*.

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{A_{amostra}}{A_{controle}} \times 100 \text{ (Equação 5)}$$

Sendo: $A_{amostra}$ = o valor da absorvância obtida após reação com MTT referente às células tratadas com diferentes concentrações dos tratamentos utilizados [OM-NLS e óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*]; e $A_{controle}$ = o valor da absorvância após reação com MTT de células não tratadas, ou seja, contendo apenas meio de cultura.

A porcentagem de viabilidade celular para as células tratadas foi expressa como média \pm desvio padrão (n=5). As análises estatísticas (análise de variância - ANOVA, seguida por *post hoc* de Bonferroni) foram realizadas como auxílio do *software Graphpad Prism* versão 5. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Os tratamentos foram considerados como citotóxicos, quando a viabilidade celular foi reduzida em mais de 30% (ISO 10993-5, 2009).

4.6 DESENVOLVIMENTO DE HIDROGEL CONTENDO OM-NLS

Como forma farmacêutica contendo as OM-NLS, optou-se por desenvolver um hidrogel mucoadesivo. Para tal, utilizou-se como base o Pemulen[®] TR1 (Lubrizol, EUA) a 1%. Foram pesados 0,1 g do Pemulen[®] TR1, que passou por trituração com auxílio de

gral e pistilo. Em seguida, foi incorporado aos poucos e com agitação 10 mL de OM-NLS, para fazer o hidrogel com OM-NLS e 10 mL de água ultrapurificada para formar o hidrogel controle. O pH foi ajustado para 7,0, adicionando-se 3 gotas de aminometilpropanol. Logo após, 100 µL de solução de imidazolidinil ureia (*Sigma-Aldrich*, EUA) a 50% foram acrescentados, para evitar a contaminação por micro-organismos.

Desse hidrogel, separou-se 2 gramas, ao qual foram acrescentadas, vagarosamente, 4,4 mL das OM-NLS em gral, homogeneizando com pistilo, para obter um hidrogel contendo 4,43% de OM.

Para verificação da estabilidade preliminar, o hidrogel foi inserido em um tubo cônico plástico e submetido a três ciclos sequenciais de centrifugação (*Eppendorf*[®] 5810 R, Alemanha): 1.000 rpm por 15 minutos; 2.000 rpm por 15 minutos; 3.000 rpm por 15 minutos. Depois de cada ciclo, foi verificada a ocorrência de modificações no aspecto do hidrogel.

4.7 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE CURTO PRAZO DO HIDROGEL CONTENDO OM-NLS

Visando avaliar se o hidrogel contendo OM-NLS manteve o teor de OM durante a estocagem em diferentes temperaturas, amostras do mesmo foram armazenadas nas temperaturas ambiente (25 °C) e sob refrigeração (4 °C), sendo analisadas nos tempos: 0, 7, 21 e 30 dias. Para isso, a mensuração do teor do OM foi realizada através de Cromatografia líquida de alta eficiência (*Agilent 1100, Hewlett Packard*, EUA), considerando o terpinen-4-ol como sendo seu marcador químico de acordo com o método descrito por Manaia (2012) com adaptações, sendo a coluna Nucleodur 100-5 ODS (4,6 x 250 mm, 5 µm, *Macherey-Nagel*[®], EUA), com volume de injeção de 2 µL, fluxo de 1 mL/minuto, temperatura da coluna de 25 °C, comprimento de onda de 200 nm e a fase móvel composta por acetonitrila (grau HPLC/ACS, *Tedia High Purity Solvents*, EUA): água, com método de eluição empregando 10 minutos de 90% de acetonitrila e 10% água, seguidos de 5 minutos de 100% de acetonitrila. Os dados foram analisados com auxílio do software *Data Analysis* embarcado no equipamento.

4.8 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

4.8.1 Linhagens fúngicas avaliadas

Para as análises microbiológicas, foram usadas as leveduras padrão de *Candida albicans* American Type Culture Collection (ATCC) 10231, *Candida glabrata* (Taniwaki, M.H.) Coleção de culturas tropicais (CCT) 0728, *Candida krusei* (FTI) CCT 1517 e *Candida guilliermondii* CCT 1890, provenientes da Fundação André Tosello (Campinas, São Paulo, Brasil), as quais foram conservadas em meio *skin milk* a -20 °C.

4.8.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração fungicida mínima (CFM)

Para determinar a CIM e a CFM, utilizou-se o protocolo M27-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2002). As linhagens de leveduras foram cultivadas a 35 ± 2 °C por 48 horas em ágar *Sabouraud dextrose* (SDA). Suspensões fúngicas de cada linhagem foram preparadas, com transmitância em espectrofotômetro (Multiskan Go-1510, *Termo Fisher Scientific*, EUA) de 89-90%, no comprimento de onda fixo de 530 nm, usando solução salina estéril 0,9% (v/v).

Foram feitas diluições das soluções em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (*Sigma Aldrich Chemistry*, EUA) tamponado com ácido 3(N-morfolino) propanosulfônico (MOPS) (*JT Baker*, Alemanha) para obtenção de 3×10^3 unidades formadoras de colônia (UFC)/mL. O pH foi ajustado para $7,0 \pm 0,1$, com auxílio de solução de hidróxido de sódio 0,5 M.

O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, as OM-NLS e hidrogel contendo OM-NLS foram avaliados empregando diluições sucessivas, cujas concentrações variaram de (25 - 0,04 mg/mL), (22,40- 0,04 mg/mL de OM) e (22,13- 0,17 mg/mL de OM), respectivamente. Os controles (brancos da nanopartícula e do hidrogel) foram analisados diretamente (puros) e diluídos em até 10 diluições.

Para a realização dos ensaios microbiológicos, foram utilizadas microplacas de polipropileno estéril, com 96 poços e de fundo chato (Kasvi- Importação e Distribuição de Produtos para Laboratórios Ltda, Brasil). Em cada poço da microplaca foram adicionados 100 µL das respectivas diluições das substâncias e 100 µL das suspensões fúngicas padronizadas. O controle de crescimento consistiu de 200 µL do mesmo meio de cultura inoculado. O controle negativo compreendeu em 200 µL de meio de cultura

não inoculado. Como fármacos de referência, foram utilizadas a anfotericina B (Cristália-Indústria farmacêutica, Brasil) e a nistatina (*Sigma Aldrich Chemistry*, EUA), nas concentrações de 0,03–16,0 µg/mL e 0,12–64 unidades internacionais (UI), respectivamente.

As microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica (NT522, Novatécnica Equipamentos para Laboratório, Brasil) a 35 ± 2 °C por 48 horas. A menor concentração na qual não houve crescimento fúngico foi tida como a CIM. Para determinar a CFM, retirou-se 10 µL dos poços onde não ocorreu crescimento no procedimento da CIM e transferiu-se para criotubos contendo 1 mL de caldo *Sabouraud* dextrose (SDB), os quais foram incubados em estufa bacteriológica (NT522, Novatécnica Equipamentos para Laboratório, Brasil) a 35 ± 2 °C por 48 horas. Após esse período, foi realizada a leitura da CFM. Nos criotubos em que se observou crescimento fúngico, a diluição foi considerada como sendo fungistática. Naqueles onde não ocorreu crescimento, classificou-se como de ação fungicida.

4.9 AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO *EX VIVO*

4.9.1 Mucosa bucal suína

As mucosas bucais suínas empregadas foram cedidas pelo Matadouro municipal de Juiz de Fora. Passaram por uma inspeção visual para garantir que estavam íntegras e inalteradas. Durante o transporte, com tempo inferior a 30 minutos, foram mantidas em recipiente isotérmico a 4 °C. Removeu-se toda a carne aderida utilizando bisturi. Em seguida foram lavadas com água corrente, secas com papel toalha e embrulhadas em parafilme e papel alumínio, para em ato contínuo serem armazenadas sob refrigeração a -80 °C (*Thermo Fisher Scientific*, EUA), até o momento do experimento. Tal protocolo foi previamente aprovado pelo Comitê de ética em experimentação animal da Universidade Federal de Juiz de Fora, sob parecer número 014/2017 (Anexo 1).

Após a utilização das mucosas no estudo, os resíduos teciduais foram acondicionados em saco plástico branco e leitoso contendo símbolo de material infectante, o qual foi descartado como material biológico, conforme as regras para descarte desse tipo de material pela Universidade Federal de Juiz de Fora.

4.9.2 Características do ensaio

Para o teste de permeação *ex vivo*, foram utilizadas células de difusão vertical (células de Franz) de 7 mL e área de difusão total de 1,86 cm², com coleta automática, prateleira agitadora com capacidade para agitação calibrada de seis células simultaneamente e banho de aquecimento com a mesma capacidade, para aquecer as células através de seu sistema de camisa de água (*Microette Plus, Hanson Research, EUA*).

Ao compartimento doador adicionaram-se alíquotas de 60 mg do hidrogel contendo OM-NLS (n=6), com o auxílio de uma pipeta de deslocamento positivo Pos-D MR-110 (*Rainin, EUA*). O meio receptor usado foi o tampão fosfato salino pH 7,4, acrescido de etanol 50% (v/v), o qual foi mantido a $32 \pm 0,5$ °C e sob agitação magnética (600 rpm) durante todo o experimento, exceto nos períodos de coleta. Entre os dois compartimentos de cada célula, posicionou-se a mucosa jugal suína, certificando-se de que não havia ar entre o meio e a mucosa. Tais mucosas foram previamente cortadas em discos circulares de 25 mm de diâmetro e colocadas 30 minutos em contato com o meio receptor para equilíbrio da temperatura. As células foram então fechadas para manutenção de oclusão por todo o experimento, com a ajuda de uma braçadeira. Realizaram-se coletas, diretamente em *vials*, em intervalos regulares de tempo (1, 2, 4, 8, 16 e 24 horas após a aplicação das amostras) de alíquotas do meio receptor (1 mL). Volume semelhante ao coletado foi imediatamente repostado na mesma temperatura. A tubulação do sistema foi rinsada com 1,5 mL de meio receptor, 30 segundos antes de cada coleta para evitar interferência de coletas anteriores, período no qual não houve agitação.

A concentração de OM (considerando o terpinen-4-ol como sendo seu marcador químico) em cada tempo de coleta foi determinada utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (*Agilent 1100, Hewlett Packard, EUA*), sendo a coluna Nucleodur 100-5 ODS (4,6 x 250 mm, 5 µm, *Macherey-Nagel*[®], EUA), com volume de injeção de 2 µL, fluxo de 1 mL/minuto, temperatura da coluna de 25 °C, comprimento de onda de 200 nm e a fase móvel composta por acetonitrila (grau HPLC/ACS, *Tedia High Purity Solvents, EUA*): água, com método de eluição empregando 10 minutos de 90% de acetonitrila e 10% água, seguidos de 5 minutos de 100% de acetonitrila. Os dados foram analisados no software *Data Analysis* embarcado no equipamento. Calculou-se as quantidades reais permeadas de acordo com a Equação 6. Modelos matemáticos foram aplicados para

elucidação dos mecanismos envolvidos na permeação do OM a partir do hidrogel contendo o sistema nanoparticulado.

$$Q_{\text{real},t} = C_t \times V_r + \sum V_a \times C_a \quad (\text{Equação 6})$$

Sendo: $Q_{\text{real},t}$ = quantidade real permeada acumulada no tempo t ; C_t = concentração mensurada da amostra no tempo t ; V_r = volume do meio receptor; V_a = volume da amostra coletada; C_a = concentração de amostra coletada.

Com o objetivo de determinar o perfil de permeação, quantidades cumulativas do OM (μg) permeadas por unidade de área de superfície (cm^2) foram plotadas em função do tempo (hora). Visando a determinação da cinética de permeação, foram aplicados modelos matemáticos. Para avaliar se a permeação seguiu cinética de ordem zero, foram plotadas quantidades cumulativas de OM permeadas por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) versus tempo (hora); para cinética de pseudoprimeira ordem (modelo de Higuchi), quantidades cumulativas de OM permeadas por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) versus a raiz quadrada do tempo (\sqrt{t}); e o log das quantidades cumulativas de OM permeadas por área ($\log \mu\text{g}/\text{cm}^2$) versus tempo (hora) para cinética de primeira ordem. Para estes, o fluxo em estado estacionário (J_s) foi determinado a partir do coeficiente linear da curva plotada para a quantidade cumulativa de OM versus tempo. O tempo de latência (TL) representa o tempo necessário para que se atinja o fluxo em estado estacionário.

Ao final do experimento, avaliaram-se as quantidades restantes da formulação que ficaram em contato com o oclisor e na mucosa. Para tal, foram retiradas e transferidas com o auxílio de espátulas metálicas, sendo essas mergulhadas em tubos cônicos de polipropileno (Eppendorf, Alemanha), com 5 mL de acetonitrila. Transferiram-se também as mucosas bucais suínas para tubos de polipropileno, nos quais foram mergulhadas em 3 mL de acetonitrila. Esses tubos ficaram em banho ultrassônico durante 1 hora para extração do OM. As soluções obtidas foram filtradas em membranas de 0,45 μm e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (Series 1100, *Hewlett Packard*, EUA), nas mesmas condições anteriormente descritas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO CROMATOGRÁFICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia*

O perfil cromatográfico do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* apresentou composição quali-quantitativa de acordo com o preconizado pela ISO 4730:2017, exceto pela ausência/baixa concentração dos constituintes viridiflorol e globulol e pela maior concentração do limoneno e α -terpineol (Figura 9 e Tabela 1), sendo observado um total de 59 picos, os quais perfizeram 90,69%. Picos com valores menores que 0,4% não foram computados.

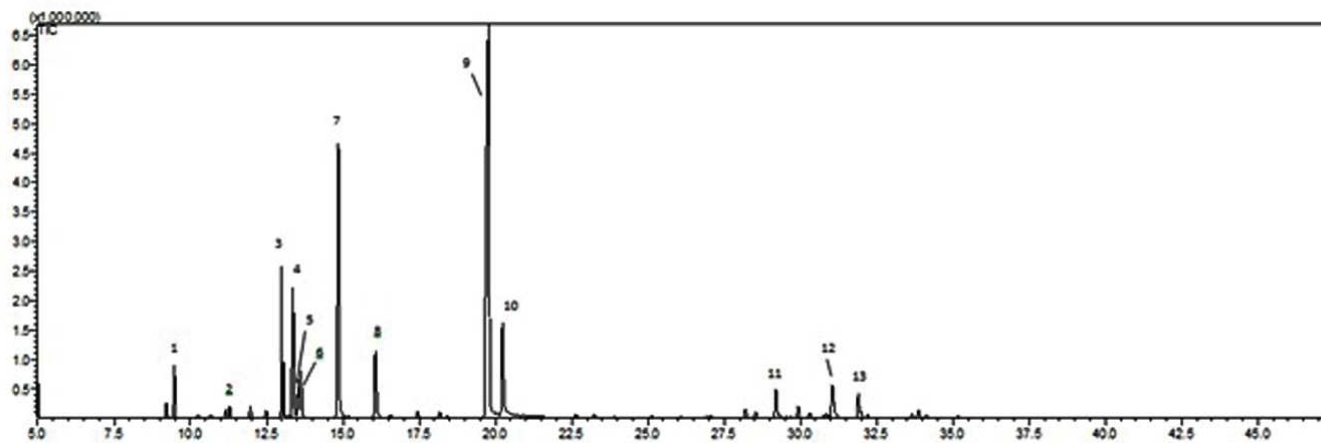


Figura 9 – Perfil cromatográfico do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*. Fonte: A autora (2021).

Tabela 1 – Constituintes do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*.

Pico	Constituinte	t _R (minuto) ^a	% Área	ISO 4730:2017	IK _{CAL}	IK _{LIT}
1	α -Pinoeno	9,475	2,31	1,0 - 4,0%	933	939*
2	Sabineno	11,175	0,41	Traços ⁺ - 3,5%	973	975*
3	α -Terpineno	13,017	8,19	6,0 - 12,0%	1017	1017*
4	ρ -Cimeno	13,362	6,56	0,5 - 8,0%	1025	1024*
5	Limoneno	13,537	1,89	0,5 - 1,5%	1029	1029*
6	1,8-Cineol	13,628	2,25	Traços ⁺ - 10,0%	1031	1031*
7	γ -Terpineno	14,851	16,32	14,0 - 28,0%	1060	1059*
8	Terpinoleno	16,069	3,80	1,5 - 5,0%	1089	1088*
9	Terpinen-4-ol	19,774	37,11	35,0 - 48,0%	1182	1177*
10	α -Terpineol	20,234	6,07	2,0 - 5,0%	1193	1188*
11	Aromadendreno	29,196	1,74	0,2 - 3,0%	1445	1441 [#]
12	Viridiflorol	31,044	2,58	0,1 - 3,0%	1501	1497 [#]
13	δ -Cadineno	31,902	1,46	0,2 - 3,0%	1529	1523 [#]

t_R-Tempo de Retenção; IK_{CAL}- Índice de Kovats calculado (com base na série homóloga de *n*-alcanos C7-C30); IK_{LIT}- Índice de Kovats da literatura (*ADAMS, 2007; [#]NICARETA, 2006); ⁺ Traços <0,4%. Fonte: A autora (2021).

O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* contém aproximadamente 100 constituintes, dentre esses se destacam hidrocarbonetos terpênicos, principalmente monoterpenos, sesquiterpenos e seus álcoois associados (CARSON, HAMMER e RILEY, 2006; GARCIA et al., 2009). Nesse contexto, terpinen-4-ol, α -pinoeno, β -pinoeno, 1,8-cineol, α -terpineol, γ -terpineno, terpinoleno e α -terpineno totalizam cerca de 90% da constituição do óleo (OLIVEIRA, 2009).

É importante ressaltar que, no caso de amostras de elevada complexidade e presença significativa de isômeros, a identificação de seus constituintes com base no tempo de retenção dos picos e nos espectros de massa obtidos pode levar a interpretações inadequadas (VON MÜHLEN, 2009). Essa observação pode ser justificada considerando que o tempo de retenção pode variar conforme o comprimento da coluna, a composição química e a espessura da fase estacionária, as temperaturas de operação, o fluxo e o tipo de gás carreador. Dessa forma, cromatógrafos idênticos, operados a partir de metodologias análogas e com os mesmos reagentes poderiam gerar diferentes tempos de retenção (MEDEIROS, 2014). Por essa razão, a utilização dos índices de retenção

constitui recurso essencial para minimizar esse inconveniente. Assim, os Índices de Kovats para os diferentes constituintes do óleo foram calculados e os resultados obtidos foram comparados aos disponíveis na literatura (Tabela 1). A partir disso, a identificação dos constituintes pôde ser adequadamente realizada.

A ISO 4730:2017 determina que o OM apresente concentração mínima de 35% de terpinen-4-ol e concentração máxima de 10% de 1,8-cineol (SOUZA, 2014). Nessa pesquisa, foram encontrados valores dentro do estabelecido para o terpinen-4-ol (37,11%) e o 1,8-cineol (2,25%). Tais resultados são importantes para atestar a qualidade do óleo essencial utilizado.

Elmi e colaboradores (2019) relataram que a composição do OM é variável e depende do clima, da idade das folhas, da forma de maceração e da duração da destilação. Para Noumi e colaboradores (2018), as folhas de *Melaleuca alternifolia* contém uma baixa quantidade de terpinen-4-ol no estágio inicial do crescimento das mudas, sendo que essa concentração aumenta com o desenvolvimento das plantas.

Diversos autores obtiveram, assim como no presente estudo, percentuais de terpinen-4-ol dentro dos estabelecidos pela ISO 4730:2017, como Elmi e colaboradores (2019) (41,49%), Noumi e colaboradores (2018) (40,4%) e Oliva e colaboradores (2018) (35,4%). No entanto, outros autores como Kong e colaboradores (2019) e Zhang e colaboradores (2018) identificaram apenas 34,95% e 31,11%, respectivamente, de terpinen-4-ol no OM, valores estes abaixo dos recomendados pelo padrão internacional citado.

Nesse contexto, ressalta-se a importância da verificação do perfil cromatográfico do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* e a comparação com os componentes requeridos pela ISO 4730:2017 para esse tipo de óleo, pois como destacaram Brun e colaboradores (2019) e Montes e colaboradores (2017), para a prática da fitoterapia segura, o primeiro passo é a identificação correta do material utilizado, estudos de segurança, de eficácia e da qualidade das plantas usadas. Porém, para Brun e colaboradores (2019), os componentes levados em consideração pelas normas ISO nem sempre correspondem aos componentes envolvidos na bioatividade.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NLS

5.2.1 Avaliação do tamanho hidrodinâmico médio das partículas, índice de polidispersividade e potencial Zeta

O critério visual foi o primeiro utilizado para avaliar as NLS. Todas se apresentaram com aspecto leitoso, homogêneas, assim como verificado por Soldati (2015), o que para ele ocorre devido à composição lipídica da manteiga, já que essa é formada por misturas de lipídios com baixo ponto de fusão, o que pode contribuir para a baixa viscosidade. A manteiga de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), feita a partir das sementes dessa fruta, é um triglicerídeo com alto valor calórico e uma composição rica em alcalóides e lipídios, principalmente ácidos graxos saturados e insaturados, que lhe confere um baixo ponto de fusão (YANG et al., 2003). A Figura 10 revela o aspecto macroscópico das OM-NLS.

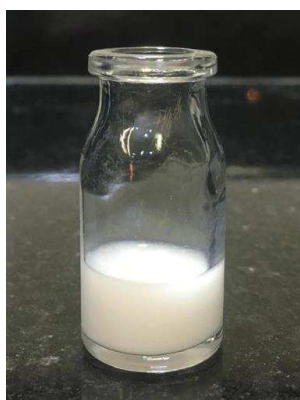


Figura 10- Aspecto macroscópico das nanopartículas lipídicas sólidas contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (OM-NLS). Fonte: A autora (2021).

Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas em nenhum dos parâmetros avaliados ($p < 0,05$) entre os dois lotes de cada uma das NLS produzidas. Os resultados das análises após 24 horas, dos dois lotes das NLS e a comparação entre as C-NLS e OM-NLS estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2: Características físico-químicas das nanopartículas produzidas em diferentes lotes.

	TP (nm)	PdI	PZ (mV)
C-NLS			
Lote 1 (n=3)	52,87 ± 0,69	0,15 ± 0,03	-20,63 ± 2,83
Lote 2 (n=3)	57,70 ± 2,39	0,28 ± 0,11	-25,37 ± 1,60
Lote 1 x Lote 2	p= 0,12	p= 0,29	p= 0,22
OM-NLS			
Lote 1 (n=3)	140,1 ± 7,69	0,16 ± 0,02	-30,27 ± 1,89
Lote 2 (n=3)	131,6 ± 12,02	0,23 ± 0,08	-31,87 ± 1,17
Lote 1 x Lote 2	p=0,59	p=0,46	p=0,51
C-NLS x OM-NLS (n=6) ^a	55,28 ± 1,55 x 135,9 ± 6,65 (p<0,0001)*	0,21 ± 0,06 x 0,19 ± 0,04 (p=0,75)	-23,00 ± 1,79 x -31,07 ± 1,05 (p= 0,0031)*

C-NLS- Nanopartículas lipídicas sólidas controle; OM-NLS- Nanopartículas lipídicas sólidas contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*; TP- Tamanho hidrodinâmico médio das partículas; PdI- Índice de polidispersividade; PZ- Potencial Zeta; nm = nanômetro; mV = miliVolts; p- Probabilidade de significância. * Foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as nanopartículas. ^a- Resultados comparativos entre as médias obtidas para os tipos de NLS. Fonte: A autora (2021).

Na nanotecnologia, tão importante quanto o desenvolvimento de novos métodos de preparo das nanopartículas, são as análises de caracterização físico-química das mesmas. Segundo Toledo (2015), características como tamanho, forma, composição, carga elétrica superficial, cor, atividade catalítica e estabilidade são dados cruciais que determinam se os objetivos estabelecidos para aquela síntese foram alcançados.

O TP mostra o tamanho das partículas presentes em suspensão (MOCKDECI et al., 2017). Diversos fatores podem influenciar esse parâmetro, como: a concentração do surfactante; tipo de lipídio; propriedades do ativo a ser encapsulado e características de produção (tempo, temperatura e pressão) (MARCATO et al., 2009). De acordo com Toledo (2015), a técnica classicamente utilizada para fazer essa medida é a de espalhamento dinâmico de luz, a qual mensura o movimento Browniano, a movimentação aleatória das partículas devido ao bombardeamento por moléculas do solvente que as rodeiam, e o correlaciona com o tamanho das partículas. Partículas menores são mais movimentadas pelas moléculas de solvente e, conseqüentemente, movem-se de forma mais veloz. Para Comin e colaboradores (2016), independentemente do método usado para obtenção, uma nanopartícula deve ter diâmetro menor que 300 nm. As nanopartículas do presente estudo apresentaram-se dentro desse padrão, conforme Tabela 2. Pode-se inferir ainda, que o TP maior nas OM-NLS em comparação com as C-NLS, pode ser um indício da encapsulação do OM nas mesmas.

O PDI indica a distribuição de tamanho das partículas e, geralmente, valores inferiores a 0,20 para suspensões coloidais são considerados bons indicadores de estabilidade (MELO et al., 2010). Para Martins (2012) e Comin e colaboradores (2016) esse valor deve ser menor que 0,25. Todas as NLS produzidas apresentaram valor de PDI próximos a 0,20 e menores que 0,25 (OM-NLS: PDI= 0,19; C-NLS: PDI=0,21), assim como recomendado por esses autores.

No que se refere ao PZ, ele reflete a carga superficial das partículas e pode ser influenciado pela composição das mesmas, pelo meio de dispersão, pelo pH e pela força iônica presentes na solução (ANGELIERI, 2013; MOCKDECI et al., 2017). Geralmente, partículas com valores de PZ de pelo menos ± 25 mV apresentam boa estabilidade coloidal quando em suspensão (MOCKDECI et al., 2017). Para Gref e Couvreur (2006), PZ superior ao módulo de 30 mV sugere suspensões mais estáveis. De acordo com Kathe, Henriksen e Chauhan (2014), NLS que manifestam potencial Zeta entre ± 20 e ± 40 mV, são tidas como estáveis e menos suscetíveis a formar agregados ou aumentar o tamanho de partícula ao longo do tempo. Pelo exposto, é possível afirmar que, quanto maior o PZ, mais estável é considerado o sistema (ANGELIERI, 2013). A explicação para tal é baseada no fato de que se as NLS possuem carga suficiente, elas podem se repelir, aumentando a estabilidade da dispersão (GREF e COUVREUR, 2006; KATHE, HENRIKSEN e CHAUHAN, 2014). Ainda, para Patel e Agrawal (2011), dispersões nanoparticuladas com PZ de ± 20 a 30 mV são categorizadas como moderadamente estáveis e $> \pm 30$ mV, altamente estáveis.

Tanto as C-NLS (PZ=-23,00) quanto as OM-NLS (PZ=-31,07) apresentaram valores de PZ dentro dos padrões satisfatórios estabelecidos na literatura científica para este parâmetro, sendo que dentro da classificação de Patel e Agrawal (2011), as NLS controle se enquadram como moderadamente estáveis e as com o ativo, altamente estáveis.

Os valores de PZ podem ser positivos ou negativos, o que varia de acordo com a natureza do polímero utilizado nas NLS (SOPPIMATH et al., 2001; SOLDATI, 2015). Os fosfolípidios, poloxamer (Pluronic[®]) e os polímeros constituintes das NLS são os principais componentes que podem afetar o PZ, por estarem envolvidos na formação do envoltório e adsorvidos a ele. Enquanto polímeros e lecitina favorecem uma carga negativa na interface, o poloxamer (Pluronic[®]), um tensoativo não-iônico, tende a reduzir o módulo do PZ (WU, ZHANG e WATANABE, 2011). Para Pires e Moura (2017) com

o uso de tensoativos não-iônicos, o PZ tende a ser negativo, devido à adsorção de íons hidroxilas na interface óleo/água provenientes das ligações de hidrogênio da água com os grupamentos químicos presentes no tensoativo e nos compostos dos óleos essenciais, tornando a carga superficial da gotícula da nanopartícula mais negativa. Conforme demonstrado na Tabela 2, todas as nanopartículas lipídicas sólidas desenvolvidas neste estudo demonstraram PZ negativo. É possível perceber que o valor de PZ apresenta-se maior para as OM-NLS. Dentro dessa dialética, sugerimos que a ionização dos constituintes do óleo essencial, tais como o terpinen-4-ol e 1,8-cineol, possa contribuir para o incremento de carga negativa nessas partículas.

Em uma análise de caracterização de nanopartículas lipídicas sólidas contendo OM, Souza e colaboradores (2017-b) encontraram um TP de $158 \text{ nm} \pm 2$, PDI de $0,213 \pm 0,017$ e PZ de $-8,69 \pm 0,80 \text{ mV}$. No presente estudo, os resultados foram próximos aos achados desses autores para TP ($135,9 \text{ nm} \pm 16,30$) e PDI ($0,19 \pm 0,10$), porém divergente para PZ ($-31,07 \text{ mV}$). O que pode estar associado a diferenças na composição das nanopartículas, como em relação à porcentagem de óleo utilizada (1,5% no trabalho de Souza e colaboradores, 2017-b; e 5% nessa pesquisa) e no lipídio sólido utilizado (cetil palmitado por Souza e colaboradores, 2017-b; e manteiga de cupuaçu nesse estudo). Para eles, a caracterização das nanopartículas de OM deve indicar uma homogeneidade adequada, pois ao se falar de partículas nanométricas, independente da metodologia aplicada, todas as formulações devem apresentar-se de forma monodispersa ($\text{PDI} < 0,25$) e o diâmetro médio deve ser abaixo de 300 nm. Todos esses parâmetros foram encontrados na caracterização das OM-NLS da presente pesquisa.

No trabalho de Pires (2019), as nanopartículas contendo OM demonstraram um TP de 172,4 nm, PDI de 0,1 e PZ de -26,35 mV, valores também próximos aos encontrados nesse estudo. Na referida pesquisa, foram relatadas diferenças significativas no potencial Zeta entre nanopartículas controle e as contendo o OM, corroborando mais uma vez com os dados da presente análise. Esse autor e Senthilkumar, Mishra e Jain (2008) atribuem tal fato à adsorção dos constituintes do óleo à superfície das nanopartículas, alterando seu valor.

5.2.2 Determinação da eficiência de encapsulação das OM-NLS

O valor de EE encontrado nas OM-NLS foi de $92,74\% \pm 0,012\%$, o que pode ser explicado pela composição variada da manteiga de cupuaçu, que devido às imperfeições

na estrutura lipídica, permite uma maior incorporação de ativos no interior do nanocarreador. De fato, alguns autores (ANDONOVA e PENEVA, 2017; BATTAGLIA e GALLARATE, 2012; SOLDATI et al., 2018) relataram que a incorporação de óleos essenciais na matriz lipídica sólida faz com que aumente o número de imperfeições na mesma, facilitando a incorporação de uma quantidade maior de fármaco, enquanto mantém a estabilidade física da nanopartícula. Outra inferência que poderia justificar o valor elevado de EE, é solubilidade satisfatória do OM nos lipídios da manteiga de cupuaçu.

A eficiência de encapsulação é descrita como a porcentagem de ativo incorporada nos lipídios da NLS em comparação com a concentração total do ativo adicionada no sistema (WANG et al., 2015). Uma elevada EE (maior que 70%) demonstra um processo de incorporação grande do ativo pelo nanocarreador, já que sua maior parte estará efetivamente na partícula (BATTAGLIA e GALLARATE, 2012; SOLDATI, 2015).

Uma das técnicas mais utilizadas para avaliar a EE por ser rápida e eficiente, e a escolhida nessa pesquisa, é a ultrafiltração-centrifugação (ANGELIERI, 2013). Consiste na utilização de uma membrana para separar a nanopartícula do meio disperso em que ela se encontra. O fármaco/ativo livre passa através da membrana, enquanto as nanopartículas ficam retidas (KATHE, HENRIKSEN e CHAUHAN, 2014). A concentração livre do ativo é determinada no ultrafiltrado e pode ser calculada pela diferença entre a concentração inicial inserida de ativo no sistema, subtraindo a concentração de ativo livre determinada no ultrafiltrado (KHERADMANDNIA et al., 2010).

Corroborando com o presente estudo, outros trabalhos também obtiveram uma EE elevada em nanopartículas contendo OM: $95,7\% \pm 0,6$ (FLORES et al., 2011); e $90,3\% \pm 2,1\%$ (PIRES, 2019).

5.2.3 Avaliação morfológica das NLS

As imagens obtidas por MET revelaram que as nanopartículas produzidas demonstraram formato esférico e com tamanhos hidrodinâmicos médios próximos aos encontrados pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (Figura 11), assim como nas pesquisas de Flores e colaboradores (2011), Pires (2019) e Souza e colaboradores (2017-a).

Nas OM-NLS, ao contrário das C-NLS, as partículas apresentaram-se isoladas, sem agregação. Tal achado corrobora com o estudo de Pires (2019). Uma hipótese para justificar esse fato da não agregação das partículas nas OM-NLS, segue o descrito por Kathe, Henriksen e Chauhan, (2014), Pires e Moura (2017) e Soldati (2015), que dissertaram que quanto maior o valor absoluto de PZ em nanopartículas lipídicas, menor a tendência à coalescência, ou seja, se as nanopartículas possuem carga suficiente, pode ocorrer a repulsão elétrica entre elas, aumentando a estabilidade da dispersão.

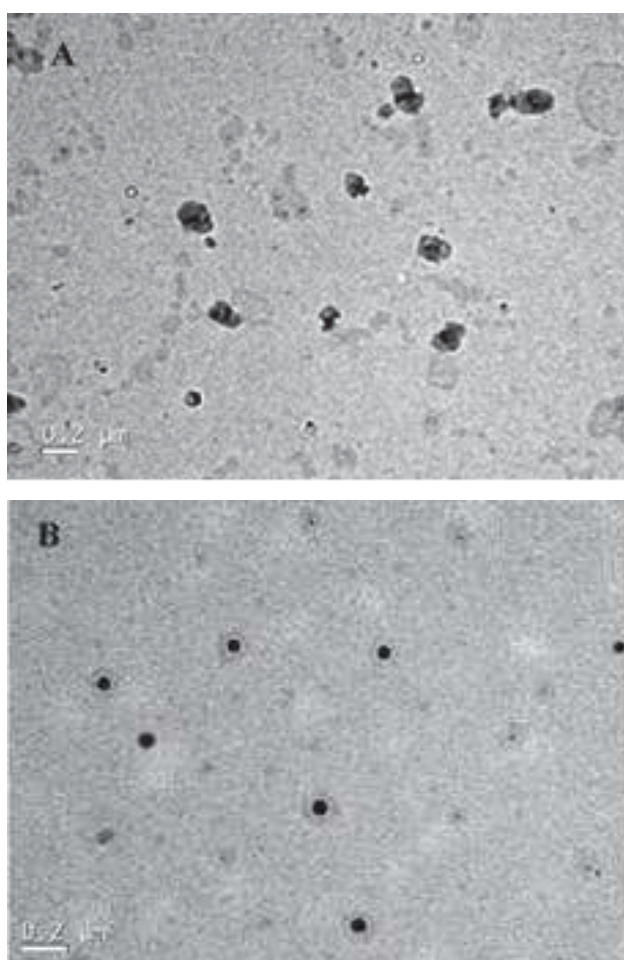


Figura 11- Eletromicrografias de transmissão das nanopartículas lipídicas sólidas. **A-** C-NLS; **B-** OM-NLS. Fonte: A autora (2021).

5.2.4 Determinação da estabilidade das NLS

Para verificar a estabilidade das NLS, os parâmetros TP e PDI foram avaliados por 120 dias (Tabela 3).

Tabela 3: Estudo da estabilidade (4 °C) das C-NLS e OM-NLS.

Nanopartículas	Tempo (dias)													
	1		15		30		45		60		90		120	
	TP (nm)	PdI	TP (nm)	PdI	TP (nm)	PdI	TP (nm)	PdI	TP (nm)	PdI	TP (nm)	PdI	TP (nm)	PdI
C-NLS	55,28 ± 3,80	0,21± 0,14	58,90 ± 6,65	0,40± 0,07	62,82 ± 10,18	0,40± 0,25	55,08 ± 4,6	0,55± 0,13	61,80 ± 2,63	0,60± 0,19	55,70 ± 5,32	0,50± 0,17	36,39 ± 8,65	0,10± 0,18
OM-NLS	135,9 ± 16,30	0,19± 0,10	130,6 ± 18,03	0,25± 0,12	150,7 ± 25,53	0,22± 0,06	128,4 ± 13,84	0,26± 0,10	133,4 ± 20,51	0,21± 0,11	131,9 ± 8,96	0,22± 0,03	126,5± 7,68	0,24± 0,07

C-NLS- Nanopartículas lipídicas sólidas controle; OM-NLS- Nanopartículas lipídicas sólidas contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*; TP- Tamanho hidrodinâmico médio das partículas; nm- nanômetro; PdI- Índice de polidispersividade. Fonte: A autora (2021).

Mudanças significativas para os critérios averiguados (TP e PdI) não foram observadas estatisticamente para as OM-NLS, demonstrando que esse sistema nanoparticulado manteve-se estável por pelo menos 120 dias sob armazenamento em geladeira (4 °C), sem que ocorresse a agregação das nanopartículas e alteração significativa na homogeneidade das mesmas, o que possivelmente ocorreu devido ao maior valor de PZ. Apesar de não ter significância estatística, em 120 dias, houve uma redução do TP para OM-NLS, porém essa diminuição é pequena quando se considera o desvio padrão e pode ser proveniente de variações de medida do próprio equipamento. Em relação à estabilidade do TP das C-NLS, foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os dias: 1-120; 15-120; 30-120; 45-120; 60-120 e 90-120. Para o PdI das C-NLS, houveram diferenças estatisticamente significativas em: 1-45; 1-60; 45-120; 60-120 e 90-120. Uma hipótese é que durante o armazenamento, a matriz lipídica sólida tende a cristalizar progressivamente, tornando-se mais compacta (GORDILLO-GALEANO e MORA-HUERTAS, 2018). No entanto, quando se adiciona um lipídio líquido, a nanopartícula tende a ficar mais estável, uma vez que esse lipídio dificulta a recristalização de lipídios sólidos e, assim, o tamanho permanece praticamente inalterado durante o armazenamento (GORDILLO-GALEANO e MORA-HUERTA, 2018). Tal acontecimento sugere que o insumo farmacêutico (OM) pode ter gerado uma melhora da estabilidade das NLS.

O parâmetro visual também foi utilizado para verificação da estabilidade. Durante o período de 120 dias, não foram observadas alterações macroscópicas em nenhuma das NLS produzidas.

As NLS podem apresentar problemas de estabilidade física, como por exemplo, a expulsão do fármaco e tendência a gelatinização e agregação (ANDONOVA e PENEVA, 2017; SCHAFFAZICK et al., 2002). Nesse contexto, vale destacar que a composição quali-quantitativa de cada formulação é condição determinante da estabilidade do sistema, que envolve as interações físico-químicas entre os componentes, principalmente do fármaco com o polímero e/ou fase oleosa (SCHAFFAZICK et al., 2002).

A estabilidade de uma formulação contendo NLS é um importante fator a ser avaliado, quando se pensa em uma potencial introdução do produto no mercado (PARDEIKE, HOMMOSS e MÜLLER, 2009). A estabilidade de armazenamento inclui aspectos físicos e químicos, dentre eles a preservação do tamanho da partícula (SOLDATI, 2015). Para Schaffazick e colaboradores (2003), a consequência de uma

estabilidade físico-química limitada, em função do tempo, constitui um obstáculo para a aplicabilidade industrial das suspensões aquosas de nanopartículas. Nesse cenário, as OM-NLS demonstraram estabilidade pelo período avaliado, sendo, portanto, um aspecto positivo e relevante quando se pensa na inserção no mercado farmacêutico de um produto desenvolvido a partir das mesmas.

5.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

No presente estudo, tanto o OM quanto as OM-NLS não apresentaram uma ação antioxidante dose-dependente, não sendo, portanto, possível o cálculo da concentração efetiva de 50% (CE_{50}), ou seja, a concentração necessária para consumir 50% dos radicais livres presentes no DPPH. A faixa de inibição para o óleo essencial foi de 14,1-27% e para as nanopartículas foi de 14,1- 17,2%, nas concentrações testadas. Apesar do efeito antioxidante encontrado não ter sido elevado, vale ressaltar que esse não é o impacto principal pretendido com o desenvolvimento da formulação, que é o antifúngico, sendo apenas uma finalidade adicional.

Durante os processos bioquímicos normais do organismo, são produzidas continuamente espécies reativas de oxigênio (EROs), que em concentrações fisiológicas participam da homeostase celular (GULÇIN, 2010). No entanto, elas também atuam em processos infecciosos, como os causados por espécies do gênero *Candida* spp., em que as leveduras são absorvidas pelos fagócitos e expostas as EROs, as quais contribuem para a morte dos micro-organismos (ABEGG et al., 2012; MIRALOGLU, 2016). Provocam danos celulares por meio do ataque direto da espécie química reativa às proteínas da célula fúngica, sendo os ácidos graxos e as lipoproteínas da membrana alvos fáceis. Podem interagir com o nitrogênio da base nitrogenada do ácido desoxirribonucleico (DNA), evitando a replicação e divisão celular (MOTTA, 2012; SHEENAN et al., 2001; YADAV et al., 2011).

Fekete e colaboradores (2008) revelaram que um sistema de defesa antioxidante supereficiente pode ser desvantajoso para o micro-organismo, levando a ativação do envelhecimento genômico e morte celular desencadeada por EROs. Todavia, alguns fungos patogênicos, como a *C. glabrata* possuem mecanismos antioxidantes que funcionam como uma defesa e um importante fator de virulência, por aumentarem a sua tolerância às EROs e asseguram a sua resistência ao stress oxidativo e sobrevivência no interior da célula de defesa do hospedeiro (MIRALOGLU, 2016).

Nesse contexto, o conhecimento dos mecanismos envolvidos no stress oxidativo em fungos, representa uma linha interessante no processo de eliminação dessas leveduras e, portanto, para o desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos (MOTTA, 2012).

Ainda, Kim e colaboradores (2004) destacaram que o conhecimento da atividade antioxidante do OM se faz importante, já que antioxidantes naturais estão intimamente relacionados com suas biofuncionalidades, como a redução de doenças crônicas e inibição do crescimento de micro-organismos patogênicos, muito associados ao término da propagação de radicais livres em sistemas biológicos, além de potencializar o valor desse óleo no mercado. Em sua pesquisa, demonstraram que a ação antioxidante do OM é atribuída principalmente a três compostos terpênicos presentes em sua composição, o *R*-terpineno, *R*-terpinoleno e γ -terpineno, atingindo aproximadamente 80% de atividade de eliminação de radicais livres, o que é comparável à do antioxidante sintético hidroxitolueno butilado, sugerindo que o OM pode se tornar um antioxidante útil.

Discordando do presente estudo, alguns autores identificaram forte atividade de eliminação de radicais para o OM, como Al-Sayed, Abdel-Daim e Khattab (2018), Al-Sayed e colaboradores (2014), Chabir e colaboradores (2011), Kuppusamy e colaboradores (2016), Rini, Ohtani e Ichiura (2012) e Zhang e colaboradores (2018). Segundo eles, essa atividade está intimamente correlacionada com o alto teor de fenol e à presença de elagitaninas. No entanto, Surh e Yun (2012) também encontraram baixa atividade antioxidante, corroborando com os resultados obtidos. Tais divergências podem ser atribuídas às diferenças entre a composição dos OM, que podem ser explicadas pela variabilidade de quimiotipos das plantas, diferenças na preparação, diferentes períodos de armazenamento e variações lote-a-lote (BRUN et al., 2019; LI et al., 2016).

5.4 CITOTOXICIDADE

Os resultados da citotoxicidade em cultura de fibroblastos murinos (L929) para o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, bem como para as OM-NLS e C-NLS, estão expressos na Figura 12.

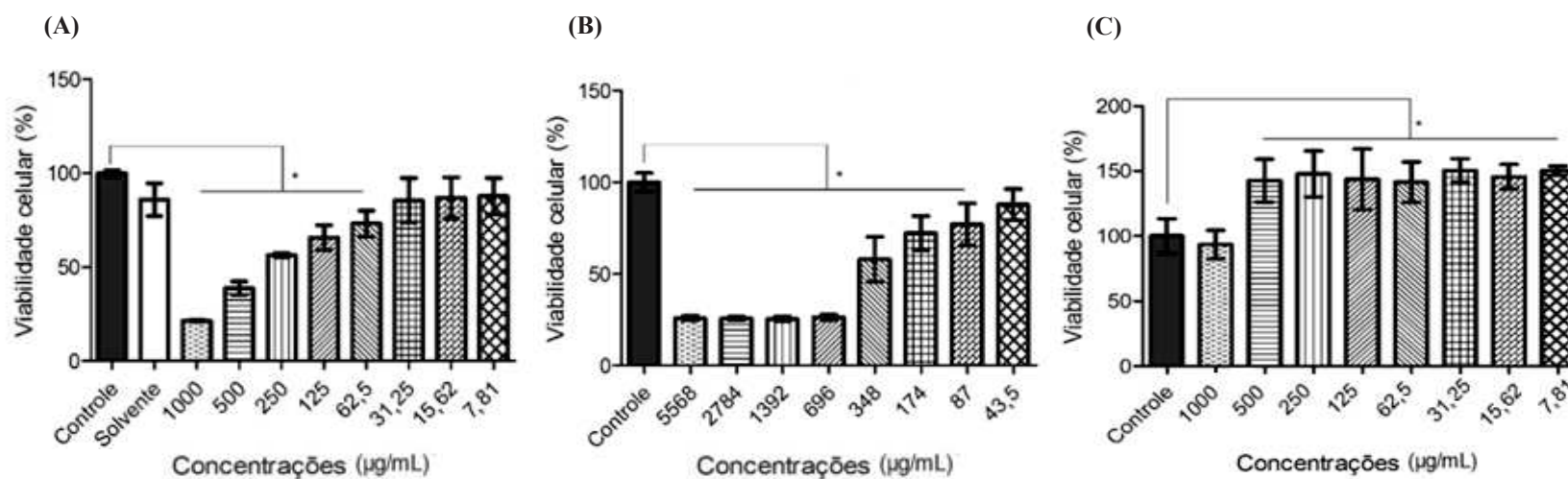


Figura 12- Viabilidade celular de fibroblastos murinos em função dos tratamentos. (A)- óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*; (B)- OM-NLS; e (C)- C-NLS. * $p < 0,05$ (ANOVA seguido *post hoc* de Bonferroni). Fonte: A autora (2021).

Em relação à viabilidade celular frente aos fibroblastos murinos (L929) do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, a CI_{50} foi de 350 $\mu\text{g/mL}$. Nas cinco primeiras concentrações (1.000 $\mu\text{g/mL}$ - 62,5 $\mu\text{g/mL}$), observou-se diferença estatisticamente significativa em relação ao controle, com variação da viabilidade celular de $21,5\% \pm 0,3$ - $73,2\% \pm 6,8$. Nas demais concentrações, não houve diferenças estatisticamente significativas, sendo a que a faixa de viabilidade celular foi de $85,6\% \pm 11,8$ - $87,8\% \pm 9,6$ (Figura 12A). Apenas as quatro últimas concentrações (62,5 $\mu\text{g/mL}$ - 7,81 $\mu\text{g/mL}$) não foram consideradas citotóxicas de acordo com a ISO 10993-5 (ISO, 2009).

Quanto as OM-NLS, a CI_{50} foi de 77,4 $\mu\text{g/mL}$ de OM. Unicamente a última concentração (43,5 $\mu\text{g/mL}$ de OM) não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparada ao grupo controle, com viabilidade celular de $87,8\% \pm 8,5$. Nas outras concentrações, a viabilidade celular manteve-se entre $25,9\% \pm 1,2$ - $77,0\% \pm 11,5$ (Figura 12B). Somente as três últimas concentrações não foram citotóxicas (174 $\mu\text{g/mL}$ - 43,5 $\mu\text{g/mL}$).

As C-NLS manifestaram toxicidade e diferença estatisticamente significativa em relação ao controle, exclusivamente na primeira concentração (1.000 $\mu\text{g/mL}$) para a linhagem celular testada, sendo a redução da viabilidade celular considerada baixa (6,64%). As demais concentrações (500-7,81 $\mu\text{g/mL}$), pelo contrário, induziram a proliferação celular, sendo que não ocorreram diferenças estatisticamente significativas comparadas ao controle (viabilidade celular variou de $141,38\% \pm 15,59$ a $150,40\% \pm 9,06$) (Figura 12C). Pode-se inferir a partir desses dados, que possivelmente na primeira concentração ocorreu uma saturação, culminando na redução da viabilidade celular, o que não aconteceu nas outras concentrações.

Em suma, no presente estudo, as substâncias avaliadas foram consideradas citotóxicas nas concentrações: OM - 125 a 1.000 $\mu\text{g/mL}$ (65,80% a 21,48% de viabilidade celular); OM-NLS - 348 a 5.568 $\mu\text{g/mL}$ de OM (58,03% a 25,87% de viabilidade celular); e C-NLS - não citotóxica nas concentrações testadas. Tais resultados demonstram que as nanopartículas controle, ou seja, sem a presença do insumo farmacêutico ativo (C-NLS) não foram citotóxicas; porém quando da incorporação do OM (OM-NLS), houve redução da viabilidade celular. Ao se comparar a CI_{50} do OM (CI_{50} = 350 $\mu\text{g/mL}$) e das OM-NLS (CI_{50} = 77,4 $\mu\text{g/mL}$ de OM), é possível notar que a nanoestruturação aumentou à citotoxicidade do referido óleo, o que pode ser sugerido pelo fato de que o ativo nanoestruturado pode apresentar maior capacidade de

interagir com a membrana plasmática das células e/ou de penetrar no interior das mesmas, sendo por isso, mais potencialmente citotóxico.

Optou-se nesse estudo pela utilização do método colorimétrico de brometo (MTT), o qual é caracterizado pela demonstração citoquímica da enzima desidrogenase succínica, que representa a taxa de respiração mitocondrial das células. Baseia-se na conversão do sal brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio] em azul de formazam, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas (STOCKERT et al., 2012). O estudo da atividade citotóxica pelo método MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (CORRÊA, 2017). Essa técnica é classificada como padrão-ouro para a determinação da viabilidade e proliferação celular (TONDER et al., 2015).

A toxicidade é um parâmetro considerado crucial para verificar a resposta biológica e o potencial para causar morte celular (CORRÊA, 2017). A utilização de cultura de células reproduz condições e até reações semelhantes às ocorridas no organismo, possibilitando observar e quantificar alterações sofridas pelas células frente a um determinado produto ou medicamento (CORRÊA, 2017; MARREIRO et al., 2014). O cultivo celular mantém o genoma do tecido vivo original e os mecanismos fundamentais de proliferação (mitoses), portanto é apontada como uma técnica alternativa aos modelos *in vivo* (ASSIS et al., 2007).

A nanoestruturação gera alterações estruturais nas substâncias, as quais são relevantes em estudos toxicológicos. A superfície reativa das nanopartículas, juntamente com as lacunas existentes nas membranas celulares, permitem a passagem de íons e moléculas para o interior das células, o que afeta potencialmente a toxicidade dos compostos (TOLEDO, 2015).

Zhang e colaboradores (2016) ressaltaram que em nanopartículas que utilizam espécies vegetais, parâmetros como tamanho, distribuição, morfologia e composição, são importantes para determinar a citotoxicidade. O tamanho influencia na biodisponibilidade, biodegradabilidade e toxicidade *in vivo* (MARCATO et al., 2012; SHINDE et al., 2012), sendo que quanto menor as partículas, maior a área superficial, maior capacidade para invadir células e, portanto, maior potencial citotóxico (NOGUEIRA et al., 2013; WEI et al., 2010).

A avaliação da citotoxicidade é importante quando se considera que ela nos permite compreender o efeito citotóxico de diferentes substâncias durante a sua interação

com os tecidos. Porém, a utilização de culturas de células em monocamadas não é fisiológica e não reproduz a real arquitetura do tecido vivo em que as células subjacentes poderiam reparar as agressões sofridas. Portanto, a presença de um efeito citotóxico *in vitro* não garante que o material é tóxico quando da utilização *in vivo* (CHORILLI, et al., 2009).

Mertas e colaboradores (2015) relataram que o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* pode ser potencialmente tóxico quando utilizado em doses elevadas. Para eles, a natureza lipofílica do OM, permite a penetração nas camadas externas da pele e intensifica não apenas as ações antissépticas, mas também a possibilidade de toxicidade do mesmo, devido à absorção dérmica. Destacaram ainda, que tal óleo pode causar irritação da pele em concentrações elevadas, reações alérgicas em indivíduos predispostos, além do efeito ototóxico; porém, não há relatos de ação genotóxica. Nesse contexto, dissertaram que a toxicidade do óleo é dose-dependente e a maioria dos efeitos adversos pode ser evitada através de sua diluição. Uma forma de reduzir a quantidade de óleo essencial utilizada é por meio da nanotecnologia, o que enfatiza a importância do presente estudo.

De acordo com Oliva e colaboradores (2018), embora hajam relatos de toxicidade cutânea e oral relacionada ao OM, seu perfil toxicológico sugere que reações graves seriam raras. Para eles, a viabilidade celular depende principalmente da dose, com citotoxicidade significativa em concentrações $\geq 10\%$ para células e $\geq 50\%$ para o tecido inteiro.

Corroborando com os achados dessa pesquisa, Elmi e colaboradores (2019) demonstraram que o OM foi tóxico para fibroblastos, células epiteliais, monócitos e neutrófilos. Söderberg, Johansson e Gref (1996) também evidenciaram atividade citotóxica para fibroblastos expostos por até 48 horas ao OM (10-1.000 $\mu\text{g/mL}$) e verificaram que a citotoxicidade do óleo é proporcional à concentração e tempo de exposição. Segundo eles, muito provavelmente, devido ao seu caráter lipofílico, o OM interage com as membranas celulares, interrompendo assim a atividade fisiológica das mesmas.

Dentro dessa dialética, Nikolic e colaboradores (2017) avaliaram a ação do OM frente a linhagens de células tumorais e observaram seletividade significativamente maior para as linhagens HeLa e FemX, do que para a linhagem celular MRC5. Liu e colaboradores (2009) comprovaram elevada citotoxicidade do OM em células

cancerígenas do pulmão (A549), mama (MCF-7) e próstata (PC-3). Assmann e colaboradores (2018) dissertaram que o OM em altas concentrações (1.000 µg/mL) também é tóxico para as linhagens celulares de fibroblastos humanos (HFF-1) e células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), diminuindo a viabilidade celular até o período de 48 horas, porém após 72 horas houve um aumento significativo na proliferação de HFF-1. Para esses autores, o OM interrompeu o ciclo celular de células MCF-7 na fase S. Complementaram ainda, que esse óleo pode atuar de maneira diferenciada na modulação do ciclo celular, de acordo com o tipo de célula tumoral. Ramadan e colaboradores (2019) igualmente revelaram a citotoxicidade do OM em diversas células neoplásicas: melanoma (A-375); células de carcinoma de células escamosas (HEp-2); carcinoma de colo do útero (HeLa); carcinoma de fígado (HepG2); leucemia; carcinoma de próstata (PC-3); câncer de pulmão (A549); e carcinoma de mama (MCF-7).

Nesse contexto, Nikolic e colaboradores (2017) e Ramage e colaboradores (2017) destacaram que a variação dos achados na literatura científica sobre a ação citotóxica do OM, pode ser explicada devido aos diferentes métodos de análise, inúmeras fontes de linhagens celulares e amostras vegetais utilizadas.

5.5 DESENVOLVIMENTO DO HIDROGEL CONTENDO OM-NLS E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE PRELIMINAR

Desenvolveu-se um hidrogel mucoadesivo contendo OM-NLS e tendo como base o Pemulen[®] TR1 (Figura 13) e em seguida, realizou-se uma avaliação da estabilidade preliminar do mesmo, na qual não foram observadas modificações (divisão em fases). Esse polímero tem sido bastante utilizado em mucosas, apresentando baixo potencial irritante, o que pode ser justificado pelo fato de ser uma macromolécula e, assim, não penetrar nos tecidos biológicos, além de ser usado em concentração considerada ínfima e, portanto, com pequena chance de causar efeitos tóxicos (SZUCS et al., 2008; TEGELI et al., 2011).

O hidrogel elaborado apresentou características organolépticas satisfatórias. Visualmente mostrou-se homogêneo, com superfície brilhante e levemente opalescente, cor branca, consistência similar a um gel-creme e odor característico do OM.



Figura 13: Aspecto macroscópico do hidrogel contendo OM-NLS. Fonte: A autora (2021).

A administração direta das OM-NLS na mucosa oral poderia resultar em grande perda do fármaco, devido à facilidade de escoamento, por possuírem consistência líquida. Visando à resolução desse percalço, as mesmas foram incorporadas em uma forma farmacêutica com maior capacidade de retenção na mucosa (hidrogel mucoadesivo).

Diante do exposto, a incorporação das OM-NLS no hidrogel mucoadesivo poderá permitir maior tempo de contato da formulação nanoestruturada com a mucosa orofaríngea, o que contribuirá para uma eficácia superior frente às cepas do gênero *Candida* spp.

5.6 ESTABILIDADE DO HIDROGEL CONTENDO OM-NLS

Com o objetivo de avaliar a influência das condições de armazenamento (temperatura ambiente e sob refrigeração) no teor do hidrogel contendo OM-NLS, ele foi analisado nos tempos 0, 7, 21 e 30 dias. Tais resultados estão expressos na Figura 14.

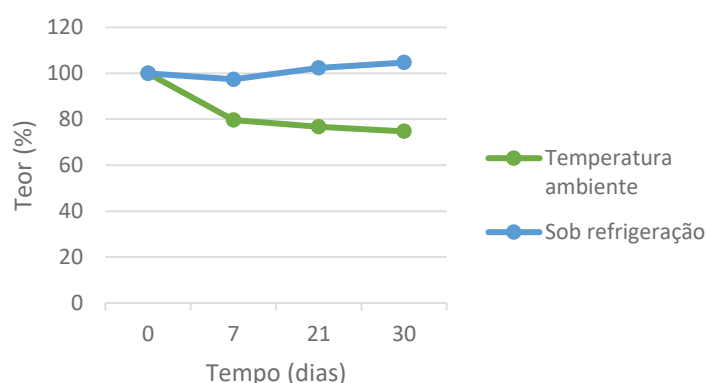


Figura 14- Avaliação da estabilidade do hidrogel contendo OM-NLS sob diferentes condições de armazenamento (temperatura ambiente e sob refrigeração). Fonte: A autora (2021).

O aspecto visual foi mantido, sem evidências macroscópicas de fenômenos de instabilidade durante pelo menos 30 dias em ambas as temperaturas avaliadas.

Após 30 dias, o hidrogel contendo OM-NLS permaneceu estável sob refrigeração, com diminuição de apenas 2,62% no teor. No entanto, houve uma redução drástica (25,3%) quando o mesmo foi armazenado à temperatura ambiente. Uma possível justificativa para este fato é a liberação do OM ao longo do tempo, fazendo com que o óleo ficasse em suspensão na fase aquosa e não mais no interior das nanopartículas, deixando-o, portanto, mais propenso a sofrer influência da temperatura de armazenamento, com conseqüente degradação, ou volatilização de seus constituintes. Essa suposição também é considerada por Pires (2019) que afirmou que ocorre uma volatilização gradual do OM à temperatura ambiente.

Flores e colaboradores (2011) e Pires (2019) similarmente avaliaram a estabilidade do teor de nanopartículas contendo OM, porém nesses estudos elas não estavam incorporadas em formulações e foram armazenadas somente na temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (ambiente). Os resultados corroboraram com a presente pesquisa, na qual nessa temperatura houve uma queda constante do teor, 20,35% em 7 dias, 23,35% em 21 dias, chegando à 25,3% em 30 dias. Flores e colaboradores (2011) revelaram uma redução de 9% em 30 dias, no entanto, após 60 dias, o teor de óleo não pôde mais ser determinado. Pires (2019) observou uma perda de 18,1% em 15 dias, 38% em 30 dias e de 86% em 60 dias.

5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Os resultados dos experimentos para verificar a atividade antifúngica estão demonstrados na Tabela 4.

Tabela 4: Verificação da atividade antifúngica das substâncias avaliadas.

Micro-organismos	Anfotericina B (µg/mL)		Nistatina (UI)		C-NLS		OM-NLS 5% (mg/mL) de OM		Hidrogel controle		Hidrogel contendo OM-NLS (mg/mL) de OM		Óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> (mg/mL)	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0,125	0,5	8	16	*	*	5,6	11,2	*	*	5,53	5,53	25	25
<i>Candida glabrata</i> CCT 0728	0,125	>16	16	>64	*	*	11,2	11,2	*	*	11,06	11,06	>25	>25
<i>Candida krusei</i> CCT 1517	2	4	16	32	*	*	11,2	11,2	*	*	5,53	11,06	>25	>25
<i>Candida guilliermondii</i> CCT 1890	0,25	>16	16	>64	*	*	5,6	5,6	*	*	11,06	11,06	>25	>25

CIM- Concentração Inibitória Mínima; CFM- Concentração Fungicida Mínima; C-NLS- Nanopartículas lipídicas sólidas controle; OM-NLS- Nanopartículas lipídicas sólidas contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*; UI- Unidades internacionais; µg/mL- micrograma por mililitro; *- não foi encontrado efeito nas concentrações testadas Fonte: A autora (2021).

De acordo com os resultados, observou-se que nem as C-NLS, nem o hidrogel controle apresentaram efeito antifúngico nas concentrações testadas frente às linhagens de *Candida* spp. utilizadas. As OM-NLS demonstraram ação fungicida com CFM = 11,2 mg/mL de OM para três das quatro espécies avaliadas e para a *C. guilliermondii*, o mesmo efeito foi verificado com CFM = 5,6 mg/mL de OM. O hidrogel contendo OM-NLS exibiu comportamento fungicida, com CFM= 5,53 mg/mL de OM para *C. albicans* e 11,06 mg/mL de OM para as demais espécies analisadas. Para o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* foi encontrada ação fungicida apenas para *C. albicans* (25 mg/mL), para as outras espécies examinadas não foram verificados efeitos antifúngicos. Em relação aos fármacos de referência, tanto a anfotericina B, como a nistatina, foram fungicidas somente para *C. albicans* (CFM= 0,5 µg/mL e CFM= 16 UI, respectivamente) e *C. krusei* (CFM= 4 µg/mL e CFM= 32 UI, respectivamente), e para as demais espécies avaliadas, o efeito encontrado foi o fungistático. Tais achados revelam que a nanoestruturação do OM possibilitou uma melhora no comportamento antifúngico, e que as C-NLS e o hidrogel controle, ou seja, sem a presença do insumo farmacêutico ativo, não possuem efeito contra as leveduras. Assim sendo, a ação fungicida das OM-NLS e do hidrogel contendo OM-NLS não decorre dos excipientes empregados no preparo dos mesmos, corroborando com dados disponíveis na literatura científica (FLORES et al., 2013; SAGAVE et al., 2015).

Flores e colaboradores (2013) demonstraram maior eficácia antifúngica com a nanoestruturação do OM (nanocápsulas e nanoemulsões), em comparação com o OM em sua forma livre. Neste cenário, Sagave e colaboradores (2015) relataram que a associação de fármacos aos sistemas nanoestruturados, devido ao seu reduzido tamanho, propicia a melhora da eficácia terapêutica dos mesmos. Para esses autores, a utilização de nanoestruturas contendo OM é benéfica e ocorre efeito antimicrobiano imediatamente após a sua aplicação. A explicação para tal fato é que o contato direto das nanopartículas de OM com a membrana do micro-organismo provoca alterações na permeabilidade e inibe a respiração celular. Ainda, a nanoestruturação auxilia promovendo a liberação gradual dos compostos, aumentando o tempo de contato e, por apresentarem reduzido tamanho, proporcionam a deposição de um maior número de partículas na superfície celular do micro-organismo, expondo maior quantidade da substância ativa (SAGAVE et al, 2015).

Para Kong e colaboradores (2019), as alterações metabólicas induzidas pelo OM e seus componentes podem estar ligadas ao bloqueio na síntese da parede celular dos fungos da membrana plasmática, citoplasma e organelas, o que afeta o crescimento e a morfologia dos fungos e esporos. Cabe ressaltar que tais autores não falam especificamente do gênero *Candida* spp. e sim de fungos de forma generalizada.

Mertas e colaboradores (2015) constataram que o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* exerceu ação antifúngica sobre ambas as cepas de *C. albicans* - sensíveis e resistentes aos azóis. Segundo eles, o OM permeia a bicamada lipídica, rompendo sua estrutura, além de inibir a formação de tubos germinativos e bloquear a respiração, culminando no rompimento da célula fúngica. Os autores atribuíram a atividade antimicrobiana desse óleo (CIM entre 0,06% e 0,25%) principalmente ao terpinen-4-ol.

Oliva e colaboradores (2018) relataram que a diferença na atividade antimicrobiana em diferentes estudos pode estar ligada à porcentagem de componentes do OM utilizado nos ensaios. Sugerem, ainda, a realização de investigações adicionais sobre a atividade de cada componente específico do OM contra os micro-organismos que se necessita combater.

Ramage e colaboradores (2012) também encontraram efeito antifúngico contra *C. albicans* tanto para óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, como para o terpinen-4-ol e α -terpineol, sendo que terpinen-4-ol e o α -terpineol apresentaram ação fungicida mais eficaz, comparando com os efeitos produzidos pelo OM. A análise por MEV de fungos tratados com OM e terpinen-4-ol revelaram que ambos os compostos promoveram comprometimento da membrana, propiciando o extravasamento de conteúdo celular, sendo o dano mais pronunciado para as células tratadas com o terpinen-4-ol.

Sun e colaboradores (2012) incorporaram o terpinen-4-ol em NLS e conseguiram viabilizar um tratamento mais eficaz contra o biofilme produzido pela *C. albicans*, devido a esta estratégia, quando comparado ao composto original.

Brun e colaboradores (2019) avaliaram o efeito do OM frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *C. glabrata*, e asseguraram que ele foi mais eficaz contra as bactérias. Ao testar diferentes lotes de OM, não encontraram uma correlação com o maior conteúdo de terpinen-4-ol e melhor efeito antifúngico, apesar de estudos prévios terem indicado o terpinen-4-ol como o principal componente ativo do OM.

Miller (1984) também demonstrou atividade antifúngica superior quando da utilização do OM, em comparação ao terpinen-4-ol isolado, mostrando a importância dos outros componentes do óleo essencial, mesmo em quantidades minoritárias.

De acordo com alguns autores (BRUN et al., 2019; MERTAS et al., 2015; NIKOLIC et al., 2017; RAMAGE et al., 2012; SUN et al., 2012), o terpinen-4-ol possui efeito antimicrobiano, porém, assim como diversos óleos essenciais, o OM é composto por vários outros componentes em proporção variável. Portanto, é muito difícil atribuir a atividade biológica a um único composto dentro da mistura complexa. Sendo assim, deve-se considerar a eficácia antimicrobiana como a interação sinérgica de muitos constituintes (BRUN et al., 2019; NIKOLIC et al., 2017).

Nesse contexto, autores destacaram a importância de se avaliar a associação de produtos naturais, como óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, com outros fármacos, na busca de novos componentes capazes de neutralizar os mecanismos de resistência encontrados em leveduras do gênero *Candida* spp., porém estudos adicionais ainda se fazem necessários (MERTAS et al., 2016; MORAIS-BRAGA et al., 2016).

5.8 AVALIAÇÃO DA PERMEACÃO *EX VIVO*

O perfil da permeação está demonstrado na Figura 15. Os resultados estão expressos na Tabela 5.

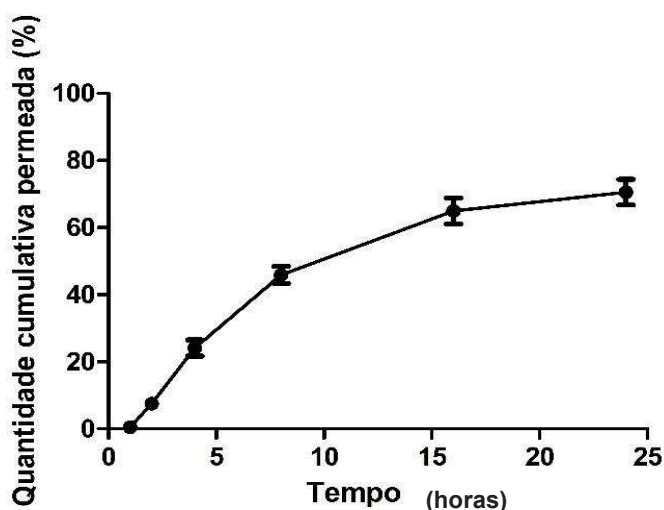


Figura 15 – Perfil de permeação *ex vivo* do terpinen-4-ol presente no hidrogel contendo OM-NLS em mucosa jugal suína. Fonte: A autora (2021).

Tabela 5: Permeação do hidrogel contendo OM-NLS em mucosa jugal suína.

Parâmetro	
Quantidade de OM aplicada (μg)	3.382,10
OM quantificado no meio receptor (μg)	2.385,18
OM quantificado na mucosa (μg)	21,85
OM perdido (oclusor) (μg)	Abaixo do limite de detecção
Percentual de recuperação (%)	71,17
Percentual de permeação (%)	70,52

Fonte: A autora (2021).

Ao final do ensaio (24 horas), foi detectado no meio receptor 2.385,18 μg (1.282,37 $\mu\text{L} / \text{cm}^2$) de OM, o que corresponde a uma porcentagem de permeação de 70,52% \pm 3,85%. Quanto à porcentagem retida no oclisor, ela foi abaixo do limite de detecção. Já na mucosa, foi verificada uma quantidade de OM de 21,85 μg , equivalente a 0,64% do total aplicado. Vale ressaltar que como a mucosa é vascularizada, essa quantidade de substância é também passível de permeação *in vivo*.

O percentual de recuperação foi abaixo da faixa ideal (71,17%). Ele representa a soma do conteúdo residual na solução doadora e receptora e a quantidade retida na mucosa, e demonstra a perda do fármaco durante o experimento. Valores entre 85-115% são considerados ideais segundo Colipa (1997). Uma possível hipótese para justificar esse ocorrido seria a obtenção de quantidades permeadas abaixo do limite de detecção em alguns pontos de coleta (inferior a 1 hora) e nos oclusores, fazendo com que parte do OM não fosse quantificada.

Para determinar o mecanismo de cinética de permeação do OM presente no hidrogel contendo OM-NLS, os resultados foram tratados matematicamente, empregando o modelo de regressão linear. Os dados foram aplicados em modelos cinéticos com o objetivo de verificar o mecanismo de permeação (Tabela 6), os quais auxiliam na predição da taxa de permeação do fármaco e também no comportamento durante a difusão dos mesmos a partir das nanopartículas, sendo útil para a compreensão da física envolvida no fenômeno de transporte (PEPPAS e NARASIMHAN, 2014; SHARMA, WALKER e PATHAK, 2011).

O modelo matemático que melhor descreveu a cinética da permeação do hidrogel contendo OM-NLS, foi o de pseudo-primeira-ordem (modelo de Higuchi), com $R^2=0,96$ (Tabela 6), ou seja, o mecanismo de permeação do OM é um processo de difusão que obedece à lei de Fick e é dependente da raiz quadrada do tempo. Tal fato revela que o perfil de permeação é controlado pela difusão do ativo através do núcleo lipídico e,

posteriormente, pela disseminação na matriz polimérica do hidrogel, o que demonstra um processo de permeação passiva do veículo para o meio receptor (COUTO et al., 2014).

Tabela 6: Parâmetros cinéticos para a permeação do hidrogel contendo OM-NLS em mucosa jugal suína.

Modelo cinético	Equação da reta	Coefficiente de determinação (R^2)	Fluxo em estado estacionário ($J_s \mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$)	Coefficiente de permeabilidade ($K_p, \text{cm/h}^{-1}$)	Tempo de latência (T_L, h)
Ordem-zero	$y = 20,499x + 52,257$	0,8773			
Higuchi	$y = 128,34x - 105,11$	0,9642	128,34	0,190	0,819
Primeira-ordem	$y = 0,065x + 1,4483$	0,5174			

Fonte: A autora (2021).

O uso de fármacos por novas vias ou novos sistemas de administração se faz relevante, com o objetivo de obter atividades terapêuticas aprimoradas, menos efeitos adversos ou a melhor adesão do paciente (MARTINS et al., 2018). Nesse contexto, a utilização da pele/mucosa como local para ministrar medicamentos é interessante não apenas quando se objetiva um tratamento local, mas também pela possibilidade de obtenção de efeito sistêmico (PRAUSNITZ, MITRAGOTRI e LANGER, 2004). A mucosa bucal é uma boa alternativa para a administração dos mesmos, pois evita o metabolismo de primeira passagem hepática, além de possuir um rico suprimento sanguíneo, alta permeabilidade, robustez, elevada capacidade de se recuperar após danos e ter características adequadas para a aplicação de mucoadesivos (CONSUELO et al., 2005; HOOGSTRAATE et al., 1996). Como parte da mucosa bucal, destaca-se a mucosa jugal, que é composta por epitélio estratificado, escamoso e não ceratinizado, o que permite a maior permeação de fármacos por ela (CONSUELO et al., 2005).

Para a realização do experimento de permeação *ex vivo*, optou-se nesse estudo pela utilização da mucosa bucal (jugal) suína, em função da sua similaridade com a mucosa bucal humana. Hoogstraate e colaboradores (1996) e Martins e colaboradores (2018) relataram a correspondência dessas mucosas em relação a alguns fatores, como: permeabilidade; histologia; composição da barreira lipídica; enzimas e organização estrutural. Para Consuelo e colaboradores (2005), das regiões de mucosa bucal suína, a

mucosa jugal é bastante usada, devido a maior área superficial, porém deve-se atentar aos possíveis danos causados nela durante a mastigação e eleger uma mucosa íntegra para a realização dos ensaios.

Song e colaboradores (2004) revelaram que a permeação depende das características físico-químicas das moléculas e dos tecidos, sendo que moléculas pequenas e lipofílicas demonstram maiores taxas de penetrabilidade e geralmente por via transcelular, enquanto as hidrofílicas atravessam por via intercelular.

Dentro dessa temática, Godwin e Michnia (1999) dissertaram sobre o mecanismo de ação dos terpenos, como o terpinen-4-ol (componente majoritário do OM), no processo de permeação. Segundo eles, os terpenos promovem uma ruptura dos lipídios intercelulares do estrato córneo, reduzindo as propriedades de barreira da pele, o que possibilita o aumento da difusão de fármacos hidrofílicos nesse estrato. Para os fármacos lipofílicos, além de elevar sua difusão, os terpenos também aumentam a distribuição dos mesmos no estrato córneo. Como o OM é rico em terpenos, essa poderia ser uma justificativa para explicar o fato de ter ocorrido elevada permeação do hidrogel contendo OM-NLS.

Os testes de permeação de fármacos têm por objetivo avaliar a absorção sistêmica do ativo, revelando a eficácia e segurança da formulação (DEPIERI et al, 2015). Para Cappeti e colaboradores (2020), esse modelo de experimento fornece dados úteis no projeto de formulações tópicas contendo compostos bioativos voláteis em quantidades não apenas suficientes para sua atividade biológica, mas também dentro dos limites estabelecidos pelas autoridades reguladoras.

Outros estudos também avaliaram a permeação do OM puro ou em formulações, tendo o terpinen-4-ol como marcador químico. Entretanto, todos foram realizados em pele (humana ou suína) e não em mucosa jugal suína.

Sinha e colaboradores (2016) verificaram a permeação de um emulgel com OM (5%) em comparação com um emulgel contendo nanoemulsão de OM, em um experimento de 10 horas, encontrando respectivamente a penetração de $49,54 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ e $79,58 \mu\text{L}/\text{cm}^2$, o que demonstra que a nanoestruturação permitiu uma melhora da permeação de 1,81 vezes. Para esses autores, os sistemas nanoestruturados reduzem a tensão superficial entre o veículo e a pele em função do contato com os lipídios da mesma, provocando uma permeação mais rápida.

Reichling e colaboradores (2006) avaliaram os perfis de permeação em epiderme do terpinen-4-ol presente no OM e em formas farmacêuticas diversas (creme, pomada e emulsão) contendo 5% de OM. A permeação mais rápida foi a com a aplicação direta do OM ($0,26 \mu\text{L}/\text{cm}^2$), seguida da emulsão de OM ($0,067 \mu\text{L}/\text{cm}^2$), pomada de OM ($0,051 \mu\text{L}/\text{cm}^2$) e por último o creme de OM ($0,022 \mu\text{L}/\text{cm}^2$). Para eles, houve uma maior permeação de terpinen-4-ol no OM puro, pois nele tem-se uma maior quantidade de terpinen-4-ol, já que nas demais formas utilizadas, foi incorporado apenas 5% de OM. Corroborando com o presente estudo, esse experimento também atendeu a primeira ordem de Higuchi.

Na pesquisa de Minghetti e colaboradores (2009), foram examinadas três formulações de adesivos de monocamada com diferentes copolímeros metacrílicos (Eudragit E100; BioPSA7-4602; e Eudragit NE) contendo OM (10%), sendo verificado um perfil de permeação linear ($R^2=0,95$). Encontrou-se uma penetração em 24 horas de respectivamente $85,8 \pm 10,6 \mu\text{L}/\text{cm}^2$, $184,6 \pm 28,0 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ e $128,0 \pm 2,3 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ de terpinen-4-ol. Apesar dessa análise ter sido realizada com mucoadesivos e em 24 horas, a porcentagem de OM utilizada foi maior (10%) do que a usada no presente estudo e a composição da formulação foi diferente, além de uma ter sido feita em pele humana e a outra em mucosa bucal suína, o que explica as divergências nos resultados.

Cappeti e colaboradores (2020) avaliaram a cinética de permeação em pele de orelha de porco de uma formulação (emulsão óleo/ água) com 5% de OM, simulando o uso diário. Ao final do experimento (27 horas), houve a permeação de $49,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (49,68%) de terpinen-4-ol e as camadas da pele continham um total de 0,51% do mesmo (0,50% derme e 0,1% na epiderme). Esse experimento demonstrou taxas de permeação e retenção da formulação na mucosa menores do que as reveladas no presente estudo ($49,68\% \times 70,52\%$; e $0,51\% \times 0,64\%$), provavelmente por se tratar de uma emulsão convencional.

Cross e colaboradores (2008) mensuraram a permeação do OM puro e em solução alcoólica a 20% em pele humana, sendo a penetração de terpinen-4-ol em 24 horas de $140-310 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ (3,6 - 8%) e $18-33 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ (1,1 - 1,9%) da dose aplicada, respectivamente. Valores esses, muito abaixo dos achados nessa pesquisa.

Diante do exposto, nota-se que o hidrogel contendo OM-NLS, de forma surpreendente, permeou em grande quantidade, o que demonstra a necessidade de novos estudos, visando a avaliação *in vivo* do efeito sistêmico por meio da administração via

mucosa jugal, a análise da aplicação desse hidrogel como base promotora de permeação ou, ainda, alterações na formulação objetivando reduzir a permeação para se obter um proeminente efeito local. Houve uma divergência de resultados em relação a outros estudos, o que pode ser justificado pelas diferenças metodológicas em relação às formulações, tempo dos experimentos e modelos de pele/ mucosa utilizados.

6 CONCLUSÃO

Diante do exposto, os resultados desse estudo demonstraram que o insumo farmacêutico ativo (OM) utilizado estava de acordo com as recomendações dos órgãos reguladores. Foi possível desenvolver uma plataforma inovadora, constituída por um hidrogel mucoadesivo contendo OM encapsulado em NLS. As NLS produzidas com o referido óleo exibiram parâmetros físico-químicos de acordo com o recomendado pela literatura científica, formato esférico, elevada eficiência de encapsulação, estabilidade pelo período avaliado, ação antioxidante e atividade fungicida contra os microorganismos analisados. No entanto, a nanotecnologia não representou uma ferramenta útil em relação à redução da citotoxicidade. O hidrogel manteve seu teor por 30 dias (sob refrigeração) e apresentou ação fungicida para as espécies de *Candidas* spp. avaliadas. O ensaio de permeação em mucosa jugal suína revelou elevada taxa de permeação. Tal fato desperta o interesse pela condução de novos estudos, levando às perspectivas futuras de se avaliar *in vivo* o efeito sistêmico do hidrogel contendo OM-NLS, por meio da administração via mucosa jugal, a análise da aplicação desse hidrogel como base promotora de permeação ou, ainda, alterações na formulação objetivando reduzir a permeação para se obter um maior efeito local.

REFERÊNCIAS

ABEGG, M. A.; ALABARSE, P. V. G.; SCHÜLLER, A. K.; BENFATO, M. S. Glutathione levels in and total antioxidant capacity of *Candida* sp. cells exposed to oxidative stress caused by hydrogen peroxide. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 5, p. 620-626, 2012.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4. ed. Illinois: Alured Publishing Corporation, 2007.

AGHAZADEH, M.; BIALVAEI, A. Z.; AGHAZADEH, M.; KABIRI, F.; SALIANI, N.; YOUSEFI, M.; ESLAMI, H.; KAFIL, H. S. Survey of the Antibiofilm and Antimicrobial Effects of *Zingiber officinale* (*in Vitro* Study). **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 1-6, 2016.

AHANGARKANI, F.; BADALI, H.; REZAI, M. S.; SHOKOHI, T.; ABTAHIAN, Z.; NESHELI, H. M.; KARAMI, H.; ROILIDES, E.; TAMADDONI, A. Candidemia due to *Candida guilliermondii* in an immunocompromised infant: a case report and review of literature. **Current Medical Mycology**, v. 5, n. 1, p. 32-36, 2019.

AKÇAĞLAR, S.; ENER, B.; TÖRE, O. Acid proteinase enzyme activity in *Candida albicans* strains : a comparison of spectrophotometry and plate methods. **Turkish Journal of Biology**, v. 35, n. 5, p. 559-567, 2011.

ALEXANDER, A.; AJAZUDDIN, A.; KHAN, J.; SARAF, S.; SARAF, S. Poly (ethylene glycol) poly(lactic-co-glycolic acid) based thermosensitive injectable hydrogels for biomedical applications. **Journal of Controlled Release**, v. 172, p. 715-729, 2013-a.

ALEXANDER, B. D.; JOHNSON, M. D.; PFEIFFER, C. D.; ORTIGOSA, C. J.; CATANIA, J.; BOOKER, R.; CASTANHEIRA, M.; MESSER, S. A.; PERLIN, D. S.; PFALLER, M. A. Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of FSK mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. **Clinical Infectious Diseases**, v. 56, n. 12, p. 1724-1732, 2013- b.

ALLEN JR, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 9ª ed. Porto Alegre: Artmed, 427 f., 2013.

ALLEVATO, M. Sistemas terapêuticos transdérmicos. **Actualizaciones Terapéuticas Dermatológicas y Estéticas**, v. 30, p. 154-166, 2007.

ALMEIDA, H.; AMARAL, M. H.; LOBÃO, P.; LOBO, J. M. Pluronic® F-127 and Pluronic Lecithin Organogel (PLO): main features and their applications in topical and transdermal administration of drugs. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 15, p. 592-605, 2012.

AL-SAYED, E.; ABDEL-DAIM, M. M.; KHATTAB, M. A. Hepatoprotective activity of praecoxin A isolated from *Melaleuca ericifolia* against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. Impact on oxidative stress, inflammation, and apoptosis. **Phytotherapy Research**, v. 33, n. 2, p. 461-470, 2018.

AL-SAYED, E.; EL-LAKKANY, N. M.; SEIF EL-DIN, S. H.; SABRA, A. N. A.; HAMMA, O. A. Hepatoprotective and antioxidant activity of *Melaleuca styphelioides* on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. **Pharmaceutical Biology**, v. 52, n. 12, p. 1581-90, 2014.

ANDONOVA, V.; PENEVA, P. Characterization Methods for Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC). **Current Pharmaceutical Design**, v. 23, n. 43, p.6630-6642, 2017.

ANGELIERI, N. F. **Obtenção de nanopartículas lipídicas sólidas contendo (-)-Terpinen-4-ol**. 2013. 131 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2013.

ANTIGNAC, E.; NOHYNEK, G. J.; RE, T.; CLOUZEAU, J.; TOUTAIN, H. Safety of botanical ingredients in personal care products/cosmetics. **Food and Chemical Toxicology**, v.49, p.324-341, 2011.

ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÊNCIA SANITÁRIA. **Formulário de Fitoterápicos Farmacopeia Brasileira**. 1ª ed. Brasília. v. 1, 156 p., 2018.

ARENDRUP, M.C. Candida and Candidaemia. Susceptibility and epidemiology. **Danish Medical Journal**, v. 60, n.11, p.1-32, 2013.

ARRAES, A. C. P. **Deteção da diversidade molecular de *Candida* spp. isoladas de uti neonatal**. 2012. 109 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

ASSIS, M. A.; MORELLI, A. V.; PIMENTA, F. Research groups and their scientific literature on medicinal plants: an exploratory study in the state of Rio de Janeiro. **Revista Fitos**, v. 9, n. 1, p. 1-72, 2015.

ASSIS, M. F. L.; SANTOS, E. C. O.; JESES, I. M.; JESUS, M. I.; PINTO, W. V. M.; MEDEIROS, R. L. F.; SILVA, D. F. L. Uso da cultura de células em testes diagnósticos laboratoriais em medicina e biologia. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 15, n. 3, p. 425 - 432, 2007.

ASSMANN, C. E.; CADONÁ, F. C.; BONADIMAN, B. S. R.; DORNELLESA, E. B.; TREVISAN, G.; CRUZ, I. B. M. Tea tree oil presents in vitro antitumor activity on breast cancer cells without cytotoxic effects on fibroblasts and on peripheral blood mononuclear cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 103, p. 1253–1261, 2018.

BALDISSERA, M. D.; SILVA, A. S.; OLIVEIRA, C. B.; SANTOS, R. C. V.; VAUCHER, R. A.; RAFFIN, R. P.; GOMES, P.; DAMBROS, M. G. C.; MILETTI, L. C.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDEM M. L.; MONTEIRO, S. G. Trypanocidal action of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) against *Trypanosoma evansi* *in vitro* and *in vivo* used mice as experimental model. **Experimental Parasitology**, v. 141, p. 21-27, 2014.

BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. B. G. Candidíase. **Jornal brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 22, n. 1, p. 22-38, 2010.

BATTAGLIA, L.; GALLARATE, M. Lipid nanoparticles: state of the art, new preparation methods and challenges in drug delivery. **Experts Opinion in Drug Delivery**, v. 9, n. 5, p. 497-508, 2012.

BENSADOUN, R. J.; PATTON, L. L.; LALLA, R. V.; EPSTEIN, J. B. Oropharyngeal candidiasis in head and neck cancer patients treated with radiation: update 2011. **Support Care Cancer**, v. 6, p. 737-744, 2011.

BERMAN, J.; KRYSAN, D. J. Drug resistance and tolerance in fungi. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 6, p. 319-331, 2020.

BETTONI, D. Óleo de Melaleuca. **International Journal of Pharmaceutical Compounding (edição brasileira)**, v. 6, n. 5, p. 268-269, 2004.

BHATTA, A. K.; KEYAL, U.; WANG, X. L. Photodynamic therapy for onychomycosis: A systematic review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 15, p. 228-235, 2016.

BOATTO, H. F.; MORAES, M. S.; MACHADO, A. P.; GIRÃO, M. J. B. C.; FISCHMAN, O. Correlação entre os resultados laboratoriais e os sinais e sintomas clínicos das pacientes com candidíase vulvovaginal e relevância dos parceiros sexuais na manutenção da infecção em São Paulo. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, n. 2, p. 80-84, 2007.

BODEY, G. P.; MARDANI, M.; HANNA, H. A. The epidemiology of *Candida glabrata* and *Candida albicans* fungemia in immunocompromised patients with cancer. **American Journal of Medicine**, v.1125, p.380-385, 2002.

BRASIL, Ministério da Saúde. Disponível em:
<http://www.brasil.gov.br/noticias/saude/2016/06/uso-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos-sobe-161>. Acessado em: 23 de outubro de 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política nacional de práticas integrativas e complementares no SUS – PNPIC-SUS**. Brasília: MS; 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME 2020**. Brasília: MS; 2019.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: MS; 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Sistema de Informação em Saúde para a Atenção Básica: SISAB 2017**. Brasília: MS; 2017.
- BRASIL. Senado Federal. Resolução nº 27, de 2012. **Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos**, Brasília, DF, 17 maio 2012.
- BROOKS, G. F.; CARROLL, K. C.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A.; MIETZNER, T. A. **Microbiologia médica de Jawetz, Melnick e Adelberg**. 25. ed. Porto Alegre: Ed. AMGH, 813 p., 2012.
- BRUN, P.; BERNABÈ, G.; FILIPPINI, R.; PIOVAN, A. In Vitro Antimicrobial Activities of Commercially Available Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) Essential Oils. **Current Microbiology**, v. 76, n. 1, p. 108-116, 2019.
- CABRAL, D. B. **Atividade antimicrobiana e antibiofilme de antissépticos bucais e óleo de melaleuca sobre *Candida spp.* com aplicabilidade em tubos traqueais**. 2014. 142 p. Tese (Doutorado em Ciências- Enfermagem Fundamental) - Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.
- CANESCHI, C. A. **Ação antifúngica de derivados amino álcoois e diaminas frente aos principais causadores de oncomicoses**. 2018. 133 p. Tese (Doutorado em Saúde) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2018.
- CANESCHI, C. A.; OLIVEIRA, B. A.; ALMEIDA, A. M.; CARMO, R. P.; MARTINS, F. J.; ALMEIDA, M. V.; RAPOSO, N. R. B. Antifungal activity of aminoalcohols and diamines against dermatophytes and yeast. **Medicinal Chemistry Research**, v. 29, p. 2164-2169, 2020.
- CAPETTI, F.; SGORBINI, B.; CAGLIERO, C.; ARGENZIANO, M.; CAVALLI, R.; MILANO, L.; BICCHI, C.; RUBIOLO, P. Melaleuca alternifolia Essential Oil: Evaluation of Skin Permeation and Distribution from Topical Formulations with a Solvent-Free Analytical Method. **Planta Medica**, v. 86, n. 6, p. 442-450, 2020.
- CARSON, C. F.; COOKSON, B. D.; FARRELLY, H. D.; RILEY, T. V. Susceptibility of methicillin-resistant Staphylococcus aureus to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 35, p. 421-424, 1995.
- CARSON, C. F.; HAMMER, K. A.; RILEY, T. V. Melaleuca alternifolia (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clinical Microbiology Reviews**, v.19, n. 1, p. 50-62, 2006.
- CASSONE, A.; CAUDA, R. Candida and candidiasis in HIV-infected patients where commensalism, opportunistic behavior and frank pathogenicity lose their borders. **AIDS**, v. 26, p. 1457-1472, 2012.

CHABIR, N.; ROMDHANE, M.; VALENTIN, A.; MOUKARZEL, B.; MARZOUG, H. N. B.; BRAHIM, N. B.; MARS, M.; BOUAIILA, J. Chemical Study and Antimalarial, Antioxidant, and Anticancer Activities of Melaleuca armillaris (Sol Ex Gateau) Sm Essential Oil. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 11, p. 1383-1388, 2011.

CHEN, S. M.; ZOU, Z.; QIU, X. R.; HOU, W. T.; ZHANG, Y.; FANG, W.; CHEN, Y. L.; WANG, Y. D.; JIANG, Y. Y.; SHEN, H.; NA, M. M. The critical role of Dectin-1 in host controlling systemic *Candida krusei* infection. **American Journal of Translational Research**, v. 11, n. 2, p. 721-732, 2019.

CHORILLI, M.; TAMASCIA, P.; ROSSIM, C.; SALGADO, H. R. N. Ensaios biológicos para avaliação de segurança de produtos cosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 1, p. 19-30, 2009.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute (2002). **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**; Approved Standard - CLSI document, v. 22, n. 15, M27-A2.

COLIPA. **Cosmetic ingredients: Guidelines for percutaneous absorption/penetration**. Brussels, 1997.

COLLINS, C. D.; COOKINHAM, S.; SMITH, J. Management of oropharyngeal candidiasis with localized oral miconazole therapy: efficacy, safety, and patient acceptability. **Patient Preference and Adherence**, v. 5, p. 369-374, 2011.

COLOMBO, A.; GUIMARÃES, T.; CAMARGO, L.; RICHTMANN, R.; QUEIROZTELLES, F.; SALLES, M.; CUNHA, C.; YASUDA, M.; MORETTI, M.; NUCCI, M. Brazilian guidelines for the management of candidiasis - a joint meeting report of three medical societies: Brazilian Society of Infectology, Paulista Society of Infectology and Brazilian Society of Tropical Medicine. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. 283-312, 2013-a.

COLOMBO, A. L.; GARNICA, M.; CAMARGO, L. F. A.; CUNHA, C. A.; BANDEIRA, A. C.; BORGHI, D.; CAMPOS, T. SENNA, A. L.; DIDIER, M. E. V.; DIAS, V. C. NUCCI, M. *Candida glabrata*: na emerging pathogen in Brazilian tertiary care hospitals. **Medical Mycology**, v. 51, n. 1, p. 38-44, 2013-b.

COMIN, V. M.; LOPES, L. Q.; QUATRIN, P. M.; DE SOUZA, M. E.; BONEZ, P. C.; PINTOS, F. G.; RAFFIN, R. P.; VAUCHER, R. A.; MARTINEZ, D. S.; SANTOS, R. C. Influence of Melaleuca alternifolia oil nanoparticles on aspects of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. **Microbial Pathogenesis**, v. 25, n. 93, p. 120-125, 2016.

CONSUELO, D. I.; JACQUES, Y.; PIZZOLATO, G. P.; GUY, R. H.; FALSON, F. Comparison of the lipid composition of porcine buccal and esophageal permeability barriers. **Archives of Oral Biology**, v. 50, p. 981-987, 2005.

- CORRÊA, R. O. **Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica de extratos vegetais frente aos principais microrganismos causadores da candidíase.** 2017. 101 f. Dissertação (Mestrado em Saúde) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2017.
- COUTO, A.; FERNANDES, R.; CORDEIRO, M. N.; REIS, S. S.; RIBEIRO, R. T.; PESSOA, A. M. Dermic diffusion and stratum corneum: a state of the art review of mathematical models. **Journal of Controlled Release**, v. 177, p. 74-83, 2014.
- CRAWFORD, G. H.; SCIACCA, J. R.; JAMES, W. D. Tea tree oil: cutaneous effects of the extracted oil of *Melaleuca alternifolia*. **Dermatitis**, v. 15, n. 2, p. 59-66, 2004.
- CROSS, S. E.; RUSSELL, M.; SOUTHWELL, I.; ROBERTS, M. S. Human skin penetration of the major components of Australian tea tree oil applied in its pure form and as a 20% solution *in vitro*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, p. 214-222, 2008.
- DAVIES, A. N.; BRAILSFORD, S. R.; BEIGHTON, D. Oral candidosis in patients with advanced cancer. **Oral Oncology**, v. 42, p. 698-702, 2006.
- DEEPAK, J.; YOGITA, J.; MEENAKSHI, J. Herbal cosmeceuticals. **Global Research on Traditional Reports**, v. 1, n. 1, p. 12-16, 2013.
- DELARZE, E.; SANGLARD, D. Defining the frontiers between antifungal resistance, tolerance and the concept of persistence. **Drug Resistance Updates**, v. 23, p. 12-19, 2015.
- DEPIERI, L. V.; PRAÇA, F. S. G.; CAMPOS, P. M.; BENTLEY, M. V. L. B.; Advances in the bioanalytical study of drug delivery across the skin. **Therapeutic Delivery**, v. 6, n.1, p. 173-196, 2015.
- DE ROSSI, T.; LOZOVY, M. A. B.; SILVA, R. V.; FERNANDES, E. V.; GERALDINO, T. H.; COSTA, I. C.; SARIDAKIS, H. O.; WATANABE, M. A. E.; FELIPE, I. Interações entre *Candida albicans* e Hospedeiro. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 32, n. 1, p. 15-28, 2011.
- DETONI, C. B.; SOUTO, G. D.; DA SILVA, A. L. M.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Photostability and skin penetration of different E-resveratrol-loaded supramolecular structures. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, p. 913-921, 2012.
- DI VITO, M.; MATTARELLI, P.; MODESTO, M.; GIROLAMO, A.; BALLARDINI, M.; TAMBURRO, A.; MELEDANDRI, M.; MONDELLO, F. *In Vitro* Activity of Tea Tree Oil Vaginal Suppositories against *Candida* spp. and Probiotic Vaginal Microbiota. **Phytotherapy Research**, v. 10, p. 1628-33, 2015.
- DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4-29, 2016.

ELICHAROVA, H.; HERYNKOVA, P.; ZIMMERMANNNOVA, O.; SYCHROVA, H. Potassium uptake systems of *Candida krusei*. **Yeast**, v. 36, n. 7, p. 439-448, 2019.

ELMI, A.; VENTRELLA, D.; BARONE, F.; CARNEVALI, G.; FILIPPINI, G.; PISI, A.; BENVENUTI, S.; SCOZZOLI, M.; BACCI, M. L. In Vitro Effects of Tea Tree Oil (*Melaleuca Alternifolia* Essential Oil) and its Principal Component Terpinen-4-ol on Swine Spermatozoa. **Molecules**, v. 24, n. 6, p.1-15, 2019.

ESPINEL-INGROFF, A. Novel antifungal agents, targets or therapeutic strategies for the treatment of invasive fungal diseases: a review of the literature (2005-2009). **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, n. 1, p. 15-22, 2009.

ESPINEL-INGROFF, A.; CANTÓN, E.; PEMÁN, J. Antifungal Resistance among Less Prevalent *Candida Non-albicans* and Other Yeasts versus Established and under Development Agents: A Literature Review. **Journal of fungi**, v. 7, n. 1, p. 24- 42, 2021.

FAVALESSA, O. C.; MARTINS, M. A.; HAHN, R. C. Aspectos micológicos e suscetibilidade in vitro de leveduras do gênero *Candida* em pacientes HIV positivos provenientes do Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 6, p. 673-677, 2010.

FEKETE, A.; POCSI, I.; EMRI, T.; GYETVAI, A.; GAZDAG, Z.; PESTI, M.; KARÁNYI, Z.; MAJOROS, L.; GERGELY, L.; PÓCSI, I. Physiological and morphological characterization of tert-butylhydroperoxide tolerant *Candida albicans* mutants. **Journal of Basic Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 480-487, 2008.

FELIPE, L. O.; SILVA JUNIOR, W. F. S.; ARAÚJO, K. C.; FABRINO, D. L. Lactoferrin, chitosan and *Melaleuca alternifolia*-natural products that show promise in candidiasis treatment. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 212-219, 2018.

FERREIRA, H. S.; RANGEL, M. C. Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1860-1870, 2009.

FIGUEIRAS, A.; CARVALHO, R.; VEIGA, F. Sistemas mucoadesivos de administração de fármacos na cavidade oral: Mecanismo de mucoadesão e polímeros mucoadesivos. **Revista Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde**, v. 4, n. 2, p. 216-233, 2007.

FIGUEREDO, C. A.; GURGEL, I. G. D.; GURGEL JUNIOR, G. D. A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios. **Physis Revista de Saúde Coletiva**, v. 24, n. 2, p. 381-400, 2014.

FIORINI, A.; ROSADO, F. R.; BETTEGA, E. M. S.; MELO, K. C. S.; KUKOLJ, C.; BONFIM-MENDONÇA, P. S.; SHINOBU-MESQUITA, C. S.; GHIRALDI, L. D.; CAMPANERUT, P. A. Z.; CAPOCI, I. R. G.; GODOY, J. S. R.; FERREIRA, I. C. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. *Candida albicans* protein profile changes in response to the butanolic extract of *Sapindus saponaria* L. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 58, n. 25, p. 1-8, 2016.

FLORES, F. C.; LIMA, J. A.; RIBEIRO, R. F.; ALVES, S. H.; ROLIM, C. M. B.; BECK, R. C. R.; SILVA, C. B. Antifungal Activity of Nanocapsule Suspensions Containing Tea Tree Oil on the Growth of *Trichophyton rubrum*. **Mycopathologia**, v. 175, p. 281-286, 2013.

FLORES, F. C.; RIBEIRO, R. F.; OURIQUE, A. F.; ROLIM, C. M. B.; SILVA, C. B. Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 968-972, 2011.

FORASTIERO, A.; GARCIA-GIL, V.; RIVERO-MENENDEZ, O.; GARCIA-RUBIO, R.; MONTEIRO, M. C.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; JORDAN, R.; AGORIO, I.; MELLADO, E. Rapid Development of *Candida krusei* Echinocandin Resistance during Caspofungin Therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 11, p. 6975-6982, 2015.

FORD, C. B.; FUNT, J. M.; ABBEY, D.; ISSI, L.; GUIDUCCI, C.; MARTINEZ, D. A.; DELOREY, T.; LI, B. Y.; WHITW, T. C.; CUOMO, C.; RAO, R. P.; BERMAN, J.; THOMPSON, D. A.; REGEV, A. The evolution of drug resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. **eLife**, v. 4, n. 1, p. 1-27, 2015.

GARCÊS, A.; AMARAL, M. H.; LOBO, J. M.S; SILVA, A. C. Formulations based on solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for cutaneous use: A review. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 112, p.159-167, 2018.

GARCIA, C. C.; GERMANO, C.; OSTI, N. M.; CHORILLI, M. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade físico-química de formulações de sabonete líquido íntimo acrescidas de óleo de melaleuca. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n. 3, p. 236-240, 2009.

GASPAROTO, T. H.; DIONÍSIO, T. J.; OLIVEIRA, C. E.; PORTO, V. C.; GELAN, V.; SANTOS, C. F.; CAMPANELLI, A. P.; LARA, V. S. Isolation of *Candida dubliniensis* from denture wearers. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 7, p. 959-962, 2009.

GE, Y.; GE, M. Development of tea tree oil-loaded liposomal formulation using response surface methodology. **Journal of Liposome Research**, v. 25, n. 3, p. 222-231, 2015.

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, p. 225-34, 2010.

GODWIN, D. A.; MICHNIA, B. B. Influence of Drug Lipophilicity on Terpenes as Transdermal Penetration Enhancers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, n. 8, p. 905-915, 1999.

GORDILLO-GALEANO, A.; MORA-HUERTAS, C. E. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: A review emphasizing on particle structure and drug release. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 133, p. 285-308, 2018.

GRANDO, T. H.; BALDISSERA, M. D.; GRESSLER, L. T.; DE SÁ, M. F.; BORTOLUZZI, B. N.; SCHAFFER, A. S.; EBLING, R. C.; RAFFIN, R. P.; SANTOS, R. C. V.; STEFANI, L. M.; VAUCHER, R.; LEAL, M. L. R.; MONTEIRO, S. G. *Melaleuca alternifolia* anthelmintic activity in gerbils experimentally infected by *Haemonchus contortus*. **Experimental Parasitology**, v. 170, p. 177-183, 2016.

GRAF, R.; COUVREUR, P. Nanocapsules: preparation, characterization and therapeutic application. In: **Nanoparticulates as Drug Carriers**, EUA, p. 255 - 276, 2006.

GÜLÇİN, İ. Antioxidant properties of resveratrol: A structure–activity insight. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 11, n. 1, p. 210-218, 2010.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILLEY, T. V. Susceptibility of oral bacteria to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil *in vitro*. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 18, p. 389-392, 2003.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V.; NIELSEN, J. B. A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 5, p. 616-25, 2006.

HAMMER, K. A. Treatment of acne with tea tree oil (*Melaleuca*) products: a review of efficacy, tolerability and potential modes of action. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 45, n. 2, p.106-10, 2015.

HOOGSTRAATE, A.J.; VERHOEF, J.C.; TUK, B.; PIJERS, A.; VAN LEENGOED, L.A.; VERHEIJDEN, J. H.; JUNGINGER, H. E.; BODDE, H. E. In vivo buccal delivery of fluorescein isothiocyanate-dextran 4400 with glycodeoxycholate as an absorption enhancer in pigs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 5, p. 457-460, 1996.

HOUST, J.; SPIZEK, J.; HAVLICEK, V. Antifungal Drugs. **Metabolites**, v. 10, n. 3, p. 106-122, 2020.

ISO – International Organization for Standardization. **ISO/TC 229: Nanotechnologies. ISO/TS 80004-1**. 2010. Disponível em:
<https://cdb.iso.org/cdb/termentry!display.action?entry=497541&language=1>

ISO- International Organization for Standardization. **ISO 4730:2017. Oil of Melaleuca, terpinen-4-ol type (tea tree oil)**. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization, 2017.

ISO- International Organization for Standardization. **ISO 10993-5 – Biological Evaluation of medical devices**. Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity, 3^a ed., ISO, 2009.

KABANOV, A.V.; BATRAKOVA, E.V.; ALAHKOV, V.Y. Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 82, p. 189-212, 2002.

KALAYCIOGLU, G.D.; AYDOGAN, N. Preparation and investigation of solid lipid nanoparticles for drug delivery. **Colloids And Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 510, p.77-86, 2016.

KANAPARTHY, R.; KANAPARTHY, A. The changing face of dentistry: nanotechnology. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 2799-2804, 2011.

KATHE, N.; HENRIKSEN, B.; CHAUHAN, H. Physicochemical characterization techniques for solid lipid nanoparticles: principles and limitations. **Drug Development And Industrial Pharmacy**, v. 40, n. 12, p. 1565-1575, 2014.

KATHIRAVAN, M. K.; SALAKE, A. B.; CHOTHE, A. S.; DUDHE, P. B.; WATODE, R. P.; MUKTA, M. S.; GADHWE, S. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 19, p. 5678-5698, 2012.

KHAN, M. A.; DHADED, S.; JOS, S. Commercial and Plant Extract Denture Cleansers in Prevention of Candida albicans Growth on Soft Denture Reliner: In Vitro Study. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 10, n. 2, p. 42-45, 2016.

KHERADMANDNIA, S.; VASHEGHANI-FARAHANI, E.; NOSRATI, M.; ATYABI, F. Preparation and characterization of ketoprofen-loaded solid lipid nanoparticles made from beeswax and carnauba wax. **Nanomedicine**, v. 6, p.753-759, 2010.

KIM, H. J.; CHEN, F.; WU, C.; WANG, X.; CHUNG, H. Y.; JIN, Z. Evaluation of Antioxidant Activity of Australian Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) Oil and Its Components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 2849-2854, 2004.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 241-248, 2009.

KONG, Q.; ZHANG, L.; NA, P.; QI, J.; YU, X.; LU, J.; REN, X. Antifungal mechanisms of α -terpineol and terpene-4-alcohol as the critical components of *Melaleuca alternifolia* oil in the inhibition of rot disease caused by *Aspergillus ochraceus* in postharvest grapes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 126, n. 4, p.1161-1174, 2019.

KUMAR, S.; RANDHAWA, J.K. High melting lipid based approach for drug delivery: Solid lipid nanoparticles. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 4, p.1842-1852, 2013.

KUPPUSAMY, S.; THAVAMANI, P.; MEGHARAJ, M.; NIROLA, R.; LEE, Y. B.; NAIDU, R. Assessment of antioxidant activity, minerals, phenols and flavonoid contents of common plant/tree waste extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 630-634, 2016.

KURAOKA, T.; ISHIYAMA, A.; OYAMADA, H.; OGAWA, Y.; KOBAYASHI, H. Presence of O glycosidically-linked oligosaccharides in the cell wall mannan of *Candida krusei* purified with Benanomicin A. **FEBS Open Bio**, v. 9, n. 1, p. 129-136, 2018.

LACCOURREYE, O.; WERNER, A.; LACCOURREYE, L. BONFILS, P. Benefits, pitfalls and risks of phytotherapy in clinical practice in otorhinolaryngology. **European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases**, v. 134, n. 2, p. 95-99, 2017.

LAUTERBACH, A.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. Applications and limitations of lipid nanoparticles in dermal and transdermal drug delivery via the follicular route. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 97, p. 152-63, 2015.

LESO, V.; FONTANA, L.; IAVICOLI, I. Biomedical nanotechnology: Occupational views. **Nano today**, v. 24, p. 10-14, 2019.

LI, L.; REDDING, S.; DONGARI-BAGTZOGLU, A. *Candida glabrata*: an emerging oral opportunistic pathogen. **Journal of Dental Research**, v. 86, n. 3, p. 204-215, 2007.

LIMA, J.; PAINES, T. C.; MOTTA, M. H.; WEBER, W. B.; SANTOS, S.; CRUZ, L.; SILVA, C. B. Novel Pemulen/Pullulan blended hydrogel containing clotrimazole-loaded cationic nanocapsules: Evaluation of mucoadhesion and vaginal permeation. **Material Science and Engineering**, v. 79, p. 886-893, 2017.

LIU, X.; ZU, Y.; FU, Y.; YAO, L.; GU, C.; WANG, W.; EFFERTH, T. Antimicrobial activity and cytotoxicity towards cancer cells of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **European Food Research and Technology**, v. 229, p. 247-253, 2009.

LI, X.; DUAN, S.; CHU, C.; XU, J.; ZENG, G.; LAM, A. K.; ZHOU, J.; YIN, Y.; FANG, D.; REYNOLDS, M. J.; GU, H.; JIANG, L. *Melaleuca alternifolia* concentrate inhibits in vitro entry of influenza virus into host cells. **Molecules**, v. 18, n. 8, p. 9550-66, 2013.

LI, W. R.; LI, H. L.; SHI, Q. S.; SUN, T. L.; XIE, X. B.; SONG, B.; HUANG, X.M. The dynamics and mechanism of the antimicrobial activity of tea tree oil against bacteria and fungi. **Applied Microbial and Cell Physiology**, v. 100, n. 20, p. 8865-8875, 2016.

- LOPES, C. M. C.; LAZZARINI, J. R.; SOARES JÚNIOR, J. M.; BARACAT, E. C. Phytotherapy: yesterday, today, and forever? **Revista da Associação Médica Brasileira** (1992), v. 64, n. 9, p. 765-768, 2018.
- LÓPEZ-ÁVILA, K.; DZUL-ROSADO, K. R.; LUGO-CABALLERO, C.; ARIAS-LEÓN, J. J.; ZAVALA-CASTRO, J. E. Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en *Candida albicans*. Una revisión. **Revista Biomédica**, v. 27, n. 3, p. 127-136, 2016.
- LÓPEZ-PINTOR, R. M.; HERNÁNDEZ, G.; ARRIBA, L.; ANDRÉS, A. Oral candidiasis in patients with renal transplants. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 18, n. 3, p.381-387, 2013.
- LUCAS, G. T.; MOCKDECI, H. R.; ASSIS, P. M.; DUTRA, R. C.; CAVALLI, J.; CHAVES, M. G. A. M.; RAPOSO, N. R. B. Assessment Of Different Pharmacological Activities Of *Cayaponia Tayuya* (Vell.) **Cogn. Journal of Multidisciplinary Engineering Science and Technology**, v. 6, n. 1, p. 9391-9395, 2019.
- LUDWIG, A.; JESUS, F. P. K.; DUTRA, V.; CÂNDIDO, S. L.; ALVES, S. H.; SANTURIO, J. M. Susceptibility profile of *Candida rugosa* (*Diutina rugosa*) against antifungals and compounds of essential oils. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 29, p. 154-157, 2019.
- LYRA, M. A. M.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; BRASILEIRO, M. T.; LA ROCA, M. F.; BARRAZA, J. A. Sistemas Matriciais Hidrofilicos e Mucoadesivos para Liberação Controlada de Fármacos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 5, p. 784-93, 2007.
- MACCARI, F. L. R. **Avaliação da atividade anti-proliferativa in vitro, liberação, permeação e retenção cutânea in vitro e estabilidade de emulsões contendo (-)-terpinen-4-ol**. 2011. 132 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.
- MACEDO, E. V.; GEMAL, A. L. A produção de fitomedicamentos e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n. 4, p. 290-97, 2009.
- MÄDER, K.; MEHNERT, W. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, p. 165-96, 2001.
- MANAIA, E. B. **Desenvolvimento de sistemas líquido-cristalinos multifuncionais contendo nanopartículas de TiO₂ para proteção solar e liberação controlada de terpinem-4-ol**. 2012. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2012.
- MANGUEIRA, D. F. B.; MANGUEIRA, L. F. B.; DINIZ, M. F. F. M. Candidose Oral. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 14, n. 2, p. 69-72, 2010.

MARCATO, P. D.; DURAN, M.; HUBER, S.; RAI, M.; MELO, P. S.; ALVES, O. L.; DURAN, N. Biogenic silver nanoparticles and its antifungal activity as a new topical transungual drug delivery. **Journal of Nano Research**, v. 20, p. 99-107, 2012.

MARCATO, P.D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, n. 2, p.1-37, 2009.

MARREIRO, R. O.; BANDEIRA, M. F. C. L.; DE ALMEIDA, M. C.; COELHO, C. N.; VENÂNCIO, G. N.; CONDE, N. C. O. Avaliação da citotoxicidade de um enxaguatório bucal contendo extrato de *Libidibia ferrea*. **Brazilian Research in Pediatric Dentistry and Integrated Clinic**, v. 14, n. 3, p. 34-42., 2014.

MARTA, G. N. Aspectos gerais do câncer de orofaringe. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, v. 15, n. 3, p. 49-52, 2013.

MARTINS, F. J.; CANESCHI, C. A.; VIEIRA, J. L. F.; BARBOSA, W.; RAPOSO, N. R. B. Antioxidant activity and potential photoprotective from amazon native flora extracts. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 161, p. 34-39, 2016.

MARTINS, I. C. F.; RAPOSO, N. R. B.; MOCKDECI, H. R.; POLONINI, H. C.; FERREIRA, A. O.; FABRI, G. M. C.; CHAVES, M. G. A. M. Delivering Resveratrol on the Buccal Mucosa Using Mucoadhesive Tablets: A Potential Treatment Strategy for Inflammatory Oral Lesions. **Current Drug Delivery**, v. 15, p. 254-259, 2018.

MARTINS, S.M.; WENDLING, T.; GONÇALVES, M. F.; SARMENTO, B.; FERREIRA, D. C. Development and validation of a simple reversed-phase HPLC method for the determination of camptothecin in animal organs following administration in solid lipid nanoparticles. **Journal of Chromatography B**, v. 880, p.100-107, 2012.

MATSUURA, E.; GODOY, J. S. R.; BONFIM-MENDONÇA, P. S.; MELLO, J. C. P.; SVIDZINSKI, T. I. E.; GASPARETTO, A.; MACIEL, S. M. In vitro effect of Paullinia cupana (guaraná) on hydrophobicity, biofilm formation, and adhesion of *Candida albicans* to polystyrene, composites, and buccal epithelial cells. **Archives of Oral Biology**, v. 60, p. 471-478, 2015.

MEDEIROS, F. C. M. **Caracterização química e atividade biológica de óleos essenciais de plantas do cerrado contra fungos xilófagos**. 120f. Dissertação (Mestre) – Pós-Graduação em Ciências Florestais, Departamento de Engenharia Florestal, Faculdade de Tecnologia, Universidade de Brasília. Brasília, 2014.

MELO, N. F. S.; GRILLO, R.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F.; DIAS FILHO, N. L.; PAULA, E.; ARAÚJO, D. R. Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas de poli (l-lactídeo) contendo benzocaína. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 65-69, 2010.

MERTAS, A.; GARBUSIŃSKA, A.; SZLISZKA, E.; JURECZKO, A.; KOWALSKA, M.; KRÓL, W. The influence of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) on fluconazole activity against fluconazole-resistant *Candida albicans* strains. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-9, 2015.

METIN, A.; DILEK, N.; DEMIRSEVEN, D. D. Fungal infections of the folds (intertriginous areas). **Clinics in Dermatology**, v. 33, n. 4, p. 437-447, 2015.

MIGUEL, L. M. Tendências do uso de produtos naturais nas indústrias de cosméticos da França. **Revista Geográfica de América Central**, v. 2, n. 47, p. 1-15, 2011.

MILLER, C. Pouring a healing oil over troubled waters. **Aust Dr**, v. 7, p. 14-15, 1984.

MÍMICA, L. M. J.; UEDA, S. M. Y.; MARTINO, M. D. V.; NAVARINI, A.; MARTINI, I. J. Diagnóstico de infecção por *Candida*: avaliação de testes de identificação de espécies e caracterização do perfil de suscetibilidade. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 1, p. 17-23, 2009.

MINGHETIL, P.; CASIRAGHI, A.; CILURZO, F.; GAMBARO, V.; MONTANAR, L. Formulation Study of Tea Tree Oil Patches. **Natural Product Communications**, v. 4, n. 1, p. 133 -137, 2009.

MIRALOGLU, M. Oxidative stress and fungal diseases. **Advance Laboratory Medicine International**, v. 6, n. 1, p. 7-16, 2016.

MIRANDA, S. H. S. **Desenvolvimento do método de extração em solução hexânica e identificação dos compostos do óleo de *Melaleuca alternifolia***. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Farmácia) – Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2014.

MOCKDECI, H.; POLONINI, H.; MARTINS, I.; GRANATO, A. P.; RAPOSO, N.; CHAVES, M. G. Evaluation of *ex vivo* effectiveness of commercial desensitizing dentifrices. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, v. 9, n. 4, p. 503-10, 2017.

MOHAMMED, A. K.; DHADED, S.; JOSHI, S. *Candida albicans* Growth on Soft Denture Reliner: In Vitro Study. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 10, n. 2, p. 42-45, 2016.

MONTEIRO, D. R.; TAKAMIYA, A. S.; FERESIN, L. P.; GORUP, L. F.; CAMARGO, E. R.; DELBEM, C. B.; HENRIQUES, M.; BARBOSA, D. B. Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms to silver nanoparticles in intermediate and mature development phases. **Journal of Prosthodontic Research**, v. 59, n. 1, p. 42-48, 2015.

MONTES, R. A.; SOUZA, R. O. L.; MORAES, S. R.; MIRANDA, M. G.; FRIEDE, R.; LIMA, A. L. S.; AVELAR, K. E. S. Qualidade microbiológica de drogas vegetais utilizadas na fitoterapia popular. **Revista Espacios**, v. 38, n. 11, p. 12-18, 2017.

- MORACE, G.; PERDONI, F.; BORGHI, E. Antifungal drug resistance in *Candida* species. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 2, n. 4, p. 254-259, 2014.
- MORAIS-BRAGA, M. F. B.; SALES, D. L.; CARNEIRO, J. N. P.; MACHADO, A. J. T.; SANTOS, A. T. L.; FREITAS, M. A.; MARTINS, G. M. A. B.; LEITE, N. F.; MATOS, Y. M. L. S.; TINTINO, S. R.; SOUZA, D. S. L.; MENEZES, I. R. A.; RIBEIRO-FILHO, J.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M. *Psidium guajava* L. and *Psidium brownianum* Mart ex DC.: Chemical composition and anti- *Candida* effect in association with fluconazole. **Microbial Pathogenesis**, v. 95, n. 2016, p. 200-207, 2016.
- MORSOLETO, F. M.; NAKAGAWA, I. T.; SANTOS, W. S.; MORSOLETO, M. J.; MORGADO, F. M.; MATOS, A. P. Administration of essential oil of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) in experimental muscle injury by phonoforesis. **Microscopy and Microanalysis**, v. 5, p. 79-80, 2015.
- MOSMANN, T. Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- MOTTA, A. L.; ALMEIDA, G. M. D.; ALMEIDA JÚNIOR, J. N.; BURATTINI, M. N.; ROSS, F. Candidemia epidemiology and susceptibility profile in the largest Brazilian teaching hospital complex. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 5, p. 441-448, 2010.
- MOTTA, L. F. **Planejamento racional no desenvolvimento de novos derivados de Chalcona como agentes anti- *Candida albicans***. 2012. 337 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.
- MÜLLER, R. H.; MADER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) form controlled drug delivery – a review of the state of art. **European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 161-177, 2000.
- MÜLLER, R. H.; PETERSEN, R. D.; HOMMOSS, A.; PARDEIKE, J. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 522-530, 2007.
- MULLER, R.H.; SHEGOKAR, R.; KECK, C.M. 20 years of lipid nanoparticles (SLN and NLC): present state of development and industrial applications. **Current Drug Discovery Technology**, v. 8, p. 207-227, 2011.
- MULTANI, A.; SUBRAMANIAN, A. K.; LIU, A. Y. Successful eradication of chronic symptomatic *Candida krusei* urinary tract infection with increased dose micafungin in a liver and kidney transplant recipient: case report and review of the literature. **Transplant Infectious Disease**, v. 21, n. 4, p. 1-6, 2019.

- MUNK, M.; CAMARGO, L. S. A.; QUINTÃO, C. C. R.; SILVA, S. R.; SOUZA, E. D.; RAPOSO, N. R. B.; MARCONCINI, J. M.; JORIO, A.; LADEIRA, L. O.; BRANDÃO, H. M. Biocompatibility assessment of fibrous nanomaterials in mammalian embryos. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 12, n. 5, p. 1151-1159, 2016.
- NADEEM, S. G.; HAKIM, S. T.; KAZMI, S. U. Use of CHROMagar Candida for the presumptive identification of *Candida* species directly from clinical specimens in resource-limited settings. **Libyan Journal of Medicine**, v. 5, n. 2144, p. 1-6, 2010.
- NASCIMENTO, N. R. F.; CARDOSO, J. H. L.; LESSA, L. M. A.; RORIZ-FILHO, J. S.; CUNHA, K. M. A.; FONTELES, M. C. Terpinen-4-ol: mechanisms of relaxation on rabbit duodenum. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 57, n. 4, p. 467-474, 2005.
- NETT, J. E.; ANDES, D. R. Antifungal agents: spectrum of activity, pharmacology, and clinical indications. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 51-83, 2016.
- NETO, M. M.; DANESI, C. C.; UNFER, D. T. Candidíase Bucal: Revisão da Literatura. **Saúde**, v. 31, n. 1- 2, p.16-26, 2005.
- NEVILLE, B.; DAMM, D.; ALLEN, C.; BOUQUOT, J. **Patologia oral & maxillofacial**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 972p. 2009.
- NICARETA, C. **Óleos essenciais de *Solanum* e a interação com morcegos frugívoros**. 92f. Dissertação (Mestre em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.
- NIKOLIC, M. M.; JOVANOVIĆ, K. K.; MARKOVIĆ, T. L.; MARKOVIĆ, D. L.; GLIGORIJEVIĆ, N. N.; RADULOVIĆ, S. S.; KOSTIĆ, M.; GLAMOČLIJAA, J. M.; SOKOVIĆ, M. D. Antimicrobial synergism and cytotoxic properties of *Citrus limon* L., *Piper nigrum* L. and *Melaleuca alternifolia* (Maiden and Betche) Cheel essential oils. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 69, n. 11, p. 1606-1614, 2017.
- NINOMIYA, K.; HAYAMA, K.; ISHIJIMA, S. A.; MARUYAMA, N.; IRIE, H.; KURIHARA, J.; ABE, S. Suppression of Inflammatory Reactions by Terpinen-4-ol, a Main Constituent of Tea Tree Oil, in a Murine Model of Oral Candidiasis and Its Suppressive Activity to Cytokine Production of Macrophages *in Vitro*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, n. 5, p. 838-844, 2013.
- NÓBREGA, F. F. F.; SALVADORI, M. G. S. S.; MASSON, C. J.; MELLO, C. F.; NASCIMENTO, T. S.; CARDOSO, J. H. L.; SOUSA, D. P.; ALMEIDA, R. N. Monoterpenoid Terpinen-4-ol Exhibits Anticonvulsant Activity in Behavioural and Electrophysiological Studies. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, p. 1-9, 2014.

NOGUEIRA, M. N.; AQUINO, S. G.; ROSSA JUNIOR, C.; SPOLIDORIO, D. M. Terpinen-4-ol and alpha-terpineol (tea tree oil components) inhibit the production of IL-1 β , IL-6 and IL-10 on human macrophages. **Inflammation Research**, v. 63, n. 9, p. 769-78, 2014.

NOGUEIRA, T. A. R.; FRANCO, A.; HE, Z.; BRAGA, V. S.; FIRME, L. P.; ABREUJUNIOR, C. H. Short-term usage of sewage sludge as organic fertilizer to sugarcane in a tropical soil bears little threat of heavy metal contamination. **Journal of Environmental Management**, v. 114, p. 168-177, 2013.

NOUMI, E.; MERGHNI, A.; ALRESHIDI, M. M.; HADDAD, O.; AKMADAR, G.; DE MARTINO, L.; MASTOURI, M.; CEYLAN, O.; SNOUSSI, M.; AL-SIENI, A.; DE FEO, V. *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: Models for Evaluating Anti-Quorum Sensing Activity of *Melaleuca alternifolia* Essential Oil and Its Main Component Terpinen-4-ol. **Molecules**, v. 23, p. 2672-2688, 2018.

NUCCI, M.; TELLES, F. Q.; MATUTE, T. A.; TIRABOSCHI, I. N.; CORTES, J.; ZURITA, J.; BLANCO, M. G.; SANTOLAYA, M. E.; THOMPSON, L.; OSORNIO, J. S.; ECHEVARRIA, J. I.; COLOMBO, A. L. Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey. **Plos One**, v. 8, n. 3, p. 1-7, 2013.

OLIVA, A.; COSTANTINI, S.; ANGELIS, M.; GARZOLI, S.; BOZOVIC, M.; MASCELLINO, M. T.; VULLO, V.; RAGNO, R. High Potency of *Melaleuca alternifolia* Essential Oil against Multi-Drug Resistant Gram-Negative Bacteria and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Molecules**, v. 23, 2584-2498, 2018.

OLIVEIRA, A. M.; MESQUITA, M. S.; SILVA, G. C.; LIMA, E. O.; MEDEIROS, P. L.; PAIVA, P. M. G.; SOUZA, I. A.; NAPOLEÃO, T. H. Evaluation of Toxicity and Antimicrobial Activity of an Ethanolic Extract from Leaves of *Morus alba* L. (Moraceae). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1-7, 2015.

OLIVEIRA, V.; MUNK, M. P.; BRNDÃO, H. M.; BRANDÃO, M. A. F.; GATTAZ, W. F.; RAPOSO, N. R. B. Nanotubos de carbono aplicados às neurociências: perspectivas e desafios. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 38, n. 5, p. 201-6, 2011.

OLIVEIRA, Y. **Micropropagação de *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel**. 2009. 92 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

PANDEY, S.; BADOLA, A.; BHATT, G. K.; KOTHIYAL, P. An overview on transdermal drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences**, v. 2, p. 1171-1180, 2013.

PARDEIKE J, HOMMOSS A, MÜLLER RH. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 21, n. 366, p. 170-84, 2009.

PARENTE, M.E.; ANDRADE, A.O.; ARES, G.; RUSSO, F.; JIMENEZ-KAIRUZ, A. Bioadhesive hydrogels for cosmetic applications. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 37, p. 511-518, 2015.

PATEL, V. R.; AGRAWAL, Y. K. Nanosuspension: An approach to enhance solubility of drugs. **Journal of advanced pharmaceutical technology & research**, v. 2, n. 2, p. 81-7, 2011.

PAZYAR, N.; YAGHOUBI, R.; BAGHERANI, N.; KAZEROONI, A. A review of applications of tea tree oil in dermatology. **International Journal of Dermatology**, v. 52, n. 7, p. 784-90, 2013.

PEPPAS, N. A.; NARASIMHAN, B. Mathematical models in drug delivery: How modeling has shaped the way we design new drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p.75-81, 2014.

PERES, L. B.; PERES, L. B.; ARAÚJO, P. H. H.; SAYER, C. Solid lipid nanoparticles for encapsulation of hydrophilic drugs by an organic solvent free double emulsion technique. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 140, p. 317-323, 2016.

PERLIN, D. S.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. The global problem of antifungal resistance: Prevalence, mechanisms, and management. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3099, n. 17, p. 1-10, 2017.

PFALLER, M. A. Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. **The American Journal of Medicine**, v. 125, n. 1A, p. 3-13, 2012.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; GIBBS, D. L.; NEWELL, V. A.; NAGY, E.; DOBIASOVA, S.; RINALDI, M.; BARTON, R.; VESELOV, A. *Candida krusei*, a Multidrug-Resistant Opportunistic Fungal Pathogen: Geographic and Temporal Trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 515-521, 2008.

PIEKARZ, T.; MERTAS, A.; WIATRAK, K.; RÓJ, R.; KOWNACKI, P.; SMIESZEK-WILCZEWSKA, J.; KOPCZYŃSKA, E.; WRZOL, M.; CISOWSKA, M.; SZLISZKA, E.; CZUBA, Z. P.; NIEDZIELSKA, I.; MORAWIEC, T. The Influence of Toothpaste Containing Australian *Melaleuca alternifolia* Oil and Ethanolic Extract of Polish Propolis on Oral Hygiene and Microbiome in Patients Requiring Conservative Procedures. **Molecules**, v. 22, n. 1957, p. 2-18, 2017.

PIRES, V. C. **Avaliação do potencial larvicida do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* e sua formulação em nanocápsulas poliméricas**. 2019. 107 f. Dissertação (Mestrado de Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2019.

PIRES, V. G. A.; MOURA, M. R. Preparation of new nanocomposites containing nanoemulsions of melaleuca, copaíba and lemon oil for application as biomaterial. **Química Nova**, v. 40, n. 1, p. 1-5, 2017.

POLONINI, H. C. **Desenvolvimento de formulação fotoprotetora contendo extratos vegetais da zona da mata mineira**. 2011. 199 p. Dissertação (Mestrado em Saúde) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2011.

PORTE, L.; LEÓN, P.; GÁRATE, C.; GUZMÁN, A. M.; LABARCA, J.; GARCÍA, P. Susceptibilidad a azoles y anfotericina B de aislados de *Candida* spp. Experiencia de una red de salud universitaria, entre 2004 y 2010. **Revista Chilena de Infectología**, v. 29, n. 2, p. 149-155, 2012.

PRAUSNITZ, M.R., MITRAGOTRI, S., LANGER, R. Current status and future potential of transdermal drug delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 2, p.115-124, 2004.

PRIEST, D. C.; PRIEST, M. D. Antimicrobiano e Antiinflamatório Naturais para a Acne. **Cosmet.Toilet (edição em Português)**, v. 14, n. 1, p. 55-57, 2002.

RAMADAN, M. A.; SHAWKEY, A. E.; RABEH, M. A.; ABDELLATIF, A. O. Expression of *P53*, *BAX*, and *BCL-2* in human malignant melanoma and squamous cell carcinoma cells after tea tree oil treatment *in vitro*. **Cytotechnology**, v. 71, n. 1, p. 461-473, 2019.

RAMAGE, G.; MILLIGAN, S.; LAPPIN, D. F.; SHERRY, L.; SWEENEY, P.; WILLIAMS, C. Antifungal, cytotoxic, and immunomodulatory properties of tea tree oil and its derivative components: potential role in management of oral candidosis in cancer patients. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 220, p. 1-8, 2012.

RASTEIRO, V. M. C.; DA COSTA, A. C. B. P.; ARAÚJO, C. F.; DE BARROS, P. P.; ROSSONI, R. D.; ANBINDER, A. L.; JORGE, A. O.; JUNQUEIRA, J. C. Essential oil of *Melaleuca alternifolia* for the treatment of oral candidiasis induced in an immunosuppressed mouse model. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 14, p. 489-499, 2014.

RAZZAGHI-ABYANEH, M.; SADEGHI, G.; ZEINALI, E.; ALIREZAEI, M.; SHAMS, M.; AMANI, A. Species distribution and antifungal susceptibility of *Candida* ssp. isolated from superficial candidiasis in outpatients in Iran. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 24, n. 2, p. e43-e50, 2014.

REICHLING, J.; LANDVATTER, U.; WAGNER, H.; KOSTKA, K. H.; SCHAEFER, U. F. In vitro studies on release and human skin permeation of Australian tea tree oil (TTO) from topical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 64, n. 2, p. 222-228, 2006.

RINI, P.; OHTANI, Y.; ICHIURA, H. Antioxidant, anti-hyaluronidase and antifungal activities of *Melaleuca leucadendron* Linn. leaf oils. **Journal of Wood Science**, v. 58, p. 429-436, 2012.

RIZWANULLAH, M.; AMIN, S.; MIR, S. R.; FAKHRI, K. U.; RIZVI, M. M.A. Phytochemical based nanomedicines against cancer: current status and future prospects. **Journal of Drug Targeting**, v. 26, n. 9, p. 731-752, 2017.

ROBBINS, N.; WRIGHT, G. D.; COWEN, L. E. Antifungal Drugs: The Current Armamentarium and Development of New Agents. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 5, p. 1-20, 2016.

RODRIGUES, W. Competitividade e mudança institucional na cadeia produtiva de plantas medicinais no Brasil. **Interações**, v. 17, n. 2, p. 267-277, 2016.

SAGAVE, L.; GRESSLER, L. T.; FLORES, F. C.; SILVA, C. B.; VARGAS, A. P. C.; LOVATO, M.; SANGIONI, L. A.; PÖTTER, L.; BOTTON, S. A. Atividade de nanoformulações de *Melaleuca alternifolia* e terpinen-4-ol em isolados de *Rhodococcus equi*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 1, p. 221-226, 2015.

SANTOS, E. B.; DANTAS, G. S.; SANTOS, H. B.; DINIZ, M. F. F.; SAMPAIO, F. C. Estudo etnobotânico de plantas medicinais para problemas bucais no município de João Pessoa, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1B, p. 321-324, 2009.

SANTOS, S. S. **Desenvolvimento de formulações nanotecnológicas para o tratamento da candidíase vulvovaginal**. 2012. 118p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

SAVINI, V.; CATAVITELLO, C.; ONOFRILLO, D.; MASCIARELLI, G.; ASTOLFI, D.; BALBINOT, A.; FEBBO, F.; DAMARIO, C.; DANTONIO, D. What do we know about *Candida guilliermondii*? A voyage throughout past and current literature about this emerging yeast. **Mycoses**, v. 54, n. 5, p. 434-41, 2010.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; FREITAS, L. L.; GUTERRES, S. S. Caracterização e Estudo de Estabilidade de Suspensões de Nanocápsulas e de Nanoesferas Poliméricas Contendo Diclofenaco. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 21, n. 2, p. 99-106, 2002.

SENTHILKUMAR, M.; MISHRA, P.; JAIN, N. K. Long circulating PEGylated poly(D,Llactide-co-glycolide) nanoparticulate delivery of Docetaxel to solid tumors. **Journal of Drug Targeting**, v. 16, n. 5, p. 424-35, 2008.

SHAH, G.; BAGHEL, U. S. Pharmacognostic standardization of the leaf of *Melaleuca alternifolia* (maiden & betche) Cheel. **African Journal Traditional Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 3, p. 1-11, 2017.

SHARIFI-RAD, J.; SALEHI, B.; VARONI, E. M.; SHAROPOV, F.; YOUSAF, Z.; AYATOLLAHI, A. S.; KOBARFARD, F.; SHARIFI-RAD, M.; AFDJEI, M. H.; SHARIFI-RAD, M.; IRITI, M. Plants of the *Melaleuca* Genus as Antimicrobial Agents: From Farm to Pharmacy. **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 10, p. 1475-1494, 2017.

SHARMA, R.; WALKER, R. B.; PATHAK, K. Evaluation of the kinetics and mechanism of drug release from econazole nitrate nanosponge loaded carbapol hydrogel. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v. 45, p. 25-31, 2011.

SHINDE, S. K.; GRAMPUROHIT, N. D.; GAIKWAD, D. D.; JADHAV, S. L.; GADHAVE, M. V.; SHELKE, P. K. Toxicity induced by nanoparticles. **Asian Pacific Journal Tropical Disease**, v. 2, p. 331-334, 2012.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 21, 266.

SILVA, C. J. **Morfoanatomia foliar e composição química dos óleos essenciais de sete espécies de *Melaleuca L.* (Mirtaceae)**. 89f. Dissertação (*Magister Scientiae*) – Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2007.

SILVA, C. R. G.; MELO, K. E.; LEÃO, M. V. P.; RUIS, R.; JORGE, A. O. C. Presença de *Candida* nas mucosas vaginal e bucal e sua relação com IgA salivar. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 30, n. 6, p. 300-305, 2008.

SILVA, C. S.; FIGUEIREDO, H. M.; STAMFORD, T. L. M.; SILVA, L. H. M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oil in ground beef. **International Journal of Food Microbiology**, v. 293, p. 79-86, 2019.

SILVA-ROCHA, W. P.; LEMOS, V. L. B.; FERREIRA, M. R. A.; SOARES, L. A. L.; SVIDZISNKI, T. I. E.; MILAN, E. P.; CHAVES, G. M. Effect of the crude extract of *Eugenia uniflora* in morphogenesis and secretion of hydrolytic enzymes in *Candida albicans* from the oral cavity of kidney transplant recipients. **Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n.6, p. 1-15, 2015.

SINHA, P.; SRIVASTAVA, S.; MISHRA, N.; SINGH, D. K.; LUQMAN, S.; CHANDA, D.; YADAV, N. P. Development, optimization and characterization of a novel Tea Tree Oil nanogel using response surface methodology. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 42, n. 9, p. 1434-1445, 2016.

SIQUEIRA, A. B. S.; RODRIGUEZ, L. R. N. A.; SANTOS, R. K. B.; MARINHO, R. R. B.; ABREU, S.; PEIXOTO, R. F.; GURGEL, B. C. V. Antifungal activity of propolis against *Candida* species isolated from cases of chronic periodontitis. **Brazilian Oral Research**, v. 29, n. 1, p. 1-6, 2015.

SOARES, M. R. P. S.; CANESCHI, C. A.; CHAVES, M. G. A. M.; MOTA, M.; STROPPA, P. H. F.; BARBOSA, W.; RAPOSO, N. R. B. *In vitro* antifungal activity and cytotoxicity screening of dry crude extracts from Brazilian Amazonia plants. **African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicines**, v. 15, n. 4, p. 13-21, 2018-a.

SOARES, M. R. P. S.; CORREA, R. O.; STROPPA, P. H. F.; MARQUES, F.; ANDRADE, G. F. S.; CORREA, C. C.; BRANDAO, M. A. F.; RAPOSO, N. R. B. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Caesalpinia ferrea* (Tul.) Martius extract: physicochemical characterization, antifungal activity and cytotoxicity Biosynthesis of silver nanoparticles using *Caesalpinia férrea* (Tul.) Martius extract: physicochemical characterization, antifungal activity and cytotoxicity. **PeerJ**, v. 6, p. 1-16, 2018-b.

SÖDERBERG, T. A.; JOHANSSON, A.; GREFF, R. Toxic effects of some conifer resin acids and tea tree oil on human epithelial and fibroblast cells. **Toxicology**, v. 107, n. 2, p. 99-109, 1996.

SOLDATI, P. P. **Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas utilizando manteiga natural para aplicação tópica**. 2015. 97 p. Dissertação (Mestrado em Saúde) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2015.

SOLDATI, P. P.; POLONINI, H. C.; PAES, C. Q.; RESTREPO, J. A. S.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; CHAVES, M. G. A. M.; BRANDÃO, M. A. F.; PITTELLA, F.; RAPOSO, N. R. B. Controlled release of resveratrol from lipid nanoparticles improves antioxidant effect. **IFAC Papers Online**, v. 51, n. 27, p. 16-21, 2018.

SOLIMAN, G. M. Nanoparticles as safe and effective delivery systems of antifungal agents: Achievements and challenges. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 523, n. 1, p. 15-32, 2017.

SONG, Y.; WANG, Y.; THAKUR, R.; MEIDAN, V.M.; MICHNIAK, B. Mucosal drug delivery: membranes, methodologies, and applications. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 21, p. 195-256, 2004.

SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M.H.A.; PINHO, S.C. Nanopartículas de lipídios sólidos: métodos clássicos de produção laboratorial. **Química Nova**, v. 34, p. 1762-1769, 2011.

SOUZA, C. F.; BALDISSERA, M. D.; DESCOB, S.; ZEPPENFELD, C.; ESLAVA-MOCHA, P. R.; GLORIA, E. M.; ZANETTE, R. A.; BALDISSEROTTO, B.; SILVA, A. S. *Melaleuca alternifolia* essential oil abrogates hepatic oxidative damage in silver cat fish (*Rhamdia quelen*) fed with an aflatoxin-contaminated diet. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 221, p. 10-20, 2019.

SOUZA, M. E. **Atividade antimicrobiana e antibiofilme de nanopartículas de óleo de *Melaleuca alternifolia***. 76f. Dissertação (Mestre em Nanociências) – Pós-Graduação em Nanociências, Centro Universitário Franciscano. Santa Maria, 2014.

SOUZA, M. E.; CLERICI, D. J.; VERDI, C. M.; FLECK, G.; QUATRIN, P. M.; SPAT, L. E.; BONEZ, P. C.; SANTOS, C. F.; ANTONIAZI, R. P.; ZANATTA, F. B.; GUNDEL, A.; MARTINEZ, D. S. T.; VAUCHER, R. A.; SANTOS, R. C. V. Antimicrobial activity of *Melaleuca alternifolia* nanoparticles in polymicrobial biofilm in situ. **Microbial Pathogenesis**, v. 113, p. 432-437, 2017-a.

SOUZA, M. E.; LOPES, L. Q. S.; BONEZ, P. C.; GÜNDEL, A.; MARTINEZ, D. S. T.; SAGRILLO, M. R.; GIONGO, J. L.; VAUCHER, R. A.; RAFFIN, R. P.; BOLIGON, A. A.; SANTOS, R. C. V. *Melaleuca alternifolia* nanoparticles against *Candida* species biofilms. **Microbial Pathogenesis**, v. 104, n. 2017, p. 125-132, 2017-b.

SOUZA, R. P.; YAMASHIRO, I.; GONZALEZ, F. M.; TORNIN, O.; BOTELHO, R. A.; PAES JUNIOR, A. J. O. Diagnóstico por imagem dos tumores da orofaringe. **Revista Imagem**, v. 27, n. 2, p. 127-133, 2005.

STOCKERT, J. C.; CASTRO, A. B.; CAÑETE, M.; HOROBIN, R. W.; VILLANUEVA, A. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. **Acta Histochemica**, v. 114, p.785-796, 2012.

SUDJANA, A. N.; CARSON, C. F.; CARSON, K. C.; RILEY, T. V.; HAMMER, K. A. *Candida albicans* adhesion to human epithelial cells and polystyrene and formation of biofilm is reduced by subinhibitory *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oil. **Medical Mycology**, v. 50, n. 8, p. 863-70, 2012.

SUN, L. M.; ZHANG, C. L.; LI, P. Characterization, Antibiofilm, and Mechanism of Action of Novel PEG-Stabilized Lipid Nanoparticles Loaded with Terpinen-4ol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 6150-6156, 2012.

SURH, J.; YUN, J. Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Butanol Extract of *Melaleuca leucadendron* L. **Preventive Nutrition and Food Science**, v. 17, n. 1, p. 22-28, 2012.

SWORDS, G.; HUNTER, L. K. Composition of Australian tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, n. 3, p. 734-737, 1978.

SZUCS, M.; SANDRI, G.; BONFERONI, M. C.; CARAMELLA, C. M.; VAGUI, P.; SZABO-REVESZ, P.; EROS, I. Mucoadhesive behaviour of emulsions containing polymeric Emulsifier. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 34, p. 226-235, 2008.

TANG, G-M.; WANG, Y.-T. Two Voriconazole salts: Syntheses, crystal structures, solubility and bioactivities. **Journal of Molecular Structure**, v. 1152, p. 287-293, 2018.

TATSUMI, Y.; NAGASHIMA, M.; SHIBANUSHI, T.; IWATA, A.; KANGAWA, Y.; INUI, F.; SIU, W. J. J.; PILLAI, R.; NISHIYAMA, Y. Mechanism of action of efinaconazole, a novel triazole antifungal agent. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 5, p. 2405-2409, 2013.

TAVERNA, C. G.; C'ORDOBA, S.; VIVOT, M.; SZUSZ, W.; VIVOT, W.; BOSCO-BORGEAT, M. E.; DAVEL, G. Reidentification and antifungal susceptibility profile of *Candida guilliermondii* and *Candida famata* clinical isolates from a culture collection in Argentina. **Medical Mycology**, v. 00, n. 00, p. 1-10, 2018.

TEGELI, V. S.; THORAT, Y. S.; SHIVSHARAN, U. S.; GAJELI, G. B.; KUMBHAR, S. T.; CHOUGULE, G. K. Pemulen as a versatile emulsifier. **International Journal of Drug Formulation & Research**, v. 2, n. 1, p. 52-63, 2011.

TOLEDO, A. M. N. **Encapsulação do óleo essencial de laranja em nanopartículas de quitosana: desenvolvimento e avaliação da citotoxicidade *in vitro* do produto final**. 2015. 63 p. Dissertação (Engenharia e Ciência de Alimentos) – Escola de química e alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2015.

TONDER, A. V.; JOUBERT, A. M.; CROMARTY, A. D. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. **Research Notes**, v. 8, p. 47-57, 2015.

TONON, C. C.; FRANCISCONI, R. S.; BORDINI, E. A. F.; HUACHO, M. M.; SARDI, J. C. O.; SPOLIDORIO, D. M. P. Interactions between Terpinen-4-ol and Nystatin on biofilm of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. **Brazilian Dental Journal**, v. 29, n. 4, p. 359-367, 2018.

TOREY, A.; VIJAYARATHNA, S.; JOTHY, S. L.; GOTHAI, S.; CHEN, Y.; LATHA, L. Y.; KANWAR, J. R.; DHARMARAJ, S.; SASIDHARAN, S. Exploration of the anticandidal mechanism of *Cassia spectabilis* in debilitating candidiasis. **Journal of Traditional Complementary Medicine**, v. 6, p. 97-104, 2016.

UCKER, C. D. L. **Óleo Essencial de Sementes e Folhas de *Syzygium cumini* e Óleo desodorizado de *Melaleuca alternifolia*: Potencial Antimicrobiano e Antioxidante**. 2016. 167 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

VAZQUEZ, J. A. Optimal management of oropharyngeal and esophageal candidiasis in patients living with HIV infection. **Research and Palliative Care**, v. 2, p. 89-101, 2010.

VECCHIARELLI, A.; PERICOLINI, E.; GABRIELLI, E.; PIETRELLA, D. New approaches in the development of a vaccine for mucosal candidiasis: progress and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1-7, 2012.

VICCINI, L. F.; SILVEIRA, R. S.; VALE, A. A.; CAMPOS, J. M. S.; REIS, A. C.; SANTOS, M. O.; CAMPOS, V. R.; CARPANEZ, A. G.; GRAZUL, R. M. Citral and linalool content has been correlated to DNA content in *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae). **Industrial Crops and Products**, v. 59, p. 14-19, 2014.

VIEGAS, M. C.; BASSOLI, D. G. utilização do índice de retenção linear para caracterização de compostos voláteis em café solúvel utilizando GC-MS e coluna HP-Innowax. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 2031-2034, 2007.

VIEIRA, A. J. H.; SANTOS, J. I. Mechanisms of resistance of *Candida albicans* to the antifungals fluconazole, amphotericin B and caspofungin. **Brazilian Journal of Clinical Analyses**, v. 49, n. 3, p. 235-239, 2017.

VIEIRA, T. R.; BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A. Constituintes químicos de *Melaleuca alternifolia* (MYRTACEAE). **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 536-539, 2004.

VON MÜHLEN, C. Índice de retenção em cromatografia gasosa bidimensional abrangente. **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 3, p. 21-29, 2009.

WANG, J.J.; LIU, K.S.; SUNG, K.C.; TSAI, C.Y.; FANG, J.Y. Lipid nanoparticles with different oil/fatty ester ratios as carriers of buprenorphine and its prodrugs for injection. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, p. 138-146, 2009.

WANG, J.; WANG, H.; ZHU, R.; LIU, Q.; FEI, J.; WANG, S. Anti-inflammatory activity of curcumin-loaded solid lipid nanoparticles in IL-1 β transgenic mice to the lipopolysaccharide-induced sepsis. **Biomaterials**, v. 53, p. 475-483, 2015.

WEBBOOK, National Institute of Standards and Technology (NIST). Disponível em: <https://webbook.nist.gov/chemistry/>. Acessado em 28 de agosto de 2018.

WEI, L.; TANG, J.; ZHANG, Z.; CHEN, Y.; ZHOU, G.; XI, T. Investigation of the cytotoxicity mechanism of silver nanoparticles in vitro. **Biomed Mater**, v. 5, n. 4, p. 1-6, 2010.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The world medicines situation, 2011. Traditional medicines: global situation, issues and challenges**. Geneva. 12p., 2011.

WILLE, M. P.; GUIMARÃES, T.; FURTADO, G. H. C.; COLOMBO, A. L. Historical trends in the epidemiology of candidaemia: analysis of an 11-year period in a tertiary care hospital in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 3, p. 288-292, 2013.

WISSING, S. A.; KAYSER, O.; MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 1257-1272, 2004.

WONG, H. L.; BENDAYAN, R.; RAUTH, A. M.; LI, Y.; WU, X. Y. Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 491-504, 2007.

WONG, Y. F.; WEST, R. N.; CHIN, S. T.; MARRIOTT, P. J. Evaluation of fast enantioselective multidimensional gas chromatography methods for monoterpene compounds: Authenticity control of Australian tea tree oil. **Journal of Chromatography A**, v. 7, n. 1406, p. 307-15, 2015.

WU, L.; ZHANG, J.; WATANABE, W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, p. 456-469, 2011.

YANG, H.; PROTIVA, P.; CUI, B.; MA, C.; BAGGETT, S.; HEQUET, V.; MORI, S.; WEINSTEIN, I.B.; KENNELLY, E.J. New bioactive polyphenols from *Theobroma grandiflorum* ("Cupuaçu"). **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1501-1504, 2003.

YANG, X.; LI, X.; REN, J. From French Paradox to cancer treatment: anti-cancer activities and mechanisms of resveratrol. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 806- 825, 2014.

YU, D.; WANG, J.; SHAO, X.; XU, F.; WANG, H. Antifungal modes of action of tea tree oil and its two characteristic components against *Botrytis cinerea*. **Journal Applied Microbiology**, v. 119, n. 5, p.1253-1262, 2015.

ZHANG, X. F.; LIU, Z. G.; SHEN, W.; GURUNATHAN, S. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 9, p. 1500-1534, 2016.

ZHANG, X.; GUO, Y.; GUO, L.; JIANG, H.; JI, Q. In Vitro Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Melaleuca alternifolia* Essential Oil. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1-8, 2018.

ZHOU, Y.; YANG, H.; ZHOU, X.; LUO, H.; TANG, F.; YANG, J.; ALTEROVITZ, G.; CHENG, L.; REN, B. Lovastatin synergizes with itraconazole against planktonic cells and biofilms of *Candida albicans* through the regulation on ergosterol biosynthesis pathway. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, p. 5255-5264, 2018.

ZIMMERMANN, J. B.; PAIVA, A. O.; COSTA, A. C. S.; SOUZA, A. M. G. V.; CHAGAS, A. R.; LIMA, A. A. C. Validade do diagnóstico clínico de candidíase vulvovaginal. **HU Revista**, v. 5, n. 1, p. 11-18, 2009.

ANEXO 1



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA


CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº. 014/2017 – CEUA sobre “Co-encapsulação dos óleos de *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) e *Copaifera langsdorffii* Desfontaines (Leguminosae) em Nanopartículas Lipídicas Sólidas visando o tratamento de candidíase orofaríngea e vulvovaginal”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de Guilherme Diniz Tavares com a colaboração de Nádia Rezende Barbosa Raposo e Hanny Reis Mockdeci está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 09/05/2017. Para o desenvolvimento da pesquisa serão utilizadas 24 fêmeas de suínos conforme solicitado e que serão utilizados no período de 30/07/2017 a 30/07/2019.

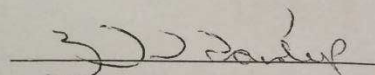
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº. 014/2017 – CEUA about “Co-encapsulação dos óleos de *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) e *Copaifera langsdorffii* Desfontaines (Leguminosae) em Nanopartículas Lipídicas Sólidas visando o tratamento de candidíase orofaríngea e vulvovaginal”, under responsibility of Guilherme Diniz Tavares, and collaboration of Nádia Rezende Barbosa Raposo e Hanny Reis Mockdeci is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 09/05/2017. For the development of the research will be used 24 females of pigs as requested and that will be used in the period from 30/07/2017 to 30/07/2019.

Juiz de Fora, 27 de abril de 2017

P. 

Vice-coordenadora
CEUA



Coordenadora
CEUA