



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**UMA BREVE REVISÃO DA APLICAÇÃO DE ÓLEOS  
ESSENCIAIS E SEUS DERIVADOS INCORPORADOS EM  
SISTEMAS COLOIDAIIS NO COMBATE À *CANDIDA*  
*ALBICANS***

**JOÃO PEDRO DORNELLES GAMBIN**

Florianópolis  
Dezembro/2020

**João Pedro Dornelles Gambin**

**UMA BREVE REVISÃO DA APLICAÇÃO DE ÓLEOS  
ESSENCIAIS E SEUS DERIVADOS INCORPORADOS EM  
SISTEMAS COLOIDAIS NO COMBATE À *CANDIDA*  
*ALBICANS***

Relatório apresentado ao Departamento de Química  
da Universidade Federal de Santa Catarina,  
como requisito parcial da disciplina de  
Estágio II (QMC 5512)

---

**Prof. Dr. Alexandre L. Parize**

---

**Doutorando Rodrigo H. Saatkamp**

Florianópolis  
Dezembro/2020

## **Agradecimentos:**

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alexandre Luis Parize, pelo apoio, aprendizado, paciência e a orientação fundamental que tive durante todo o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço imensamente por ter me acolhido no grupo de pesquisa e ter me proporcionado a oportunidade de desenvolver este projeto.

Ao meu coorientador, Rodrigo H. Saatkamp, pelo acompanhamento e aprendizado que tive desde o início, dentro e fora do laboratório. Obrigado pelo apoio, paciência e todos os ensinamentos que me foram passados envolvendo todas as etapas na realização de um trabalho de conclusão de curso como este e no dia-a-dia no laboratório.

A todo o pessoal do Grupo de Estudos em Materiais Poliméricos (POLIMAT), local de realização do trabalho. Em especial à Mariele P. Sanches, ao Adalberto E. Junior, ao Idejan P. Gross e, novamente, ao Rodrigo H. Saatkamp, pelas discussões que enriqueceram e contribuíram tanto para engrandecimento pessoal como para a realização deste trabalho de uma forma ou de outra.

Ao departamento de química e todos os professores da UFSC, que contribuíram com as ferramentas (materiais e intelectuais) necessárias para a minha formação como químico.

Aos colaboradores dos laboratórios da UFSC: LaCBio (Laboratório de Catálise Biomimética) e Polissol (Laboratório de Polímeros e Surfactantes) por disponibilizarem os equipamentos necessários para as análises realizadas no início do projeto.

Especialmente aos meus pais, pelo apoio incondicional desde sempre.

Aos meus amigos e colegas, que também, de uma forma ou de outra contribuíram e tornaram todo este processo de aprendizagem melhor.

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	8
2. Objetivos .....	10
3. Revisão da literatura .....	11
3.1. Infecções fúngicas.....	11
3.2. Resistência.....	14
3.3. Agentes antifúngicos .....	15
3.3.1. Óleos essenciais .....	18
3.3.2 Timol.....	25
3.4. Nanociência e nanotecnologia .....	26
3.5. Sistemas de liberação controlada de ativos .....	28
3.5.1. Micelas poliméricas .....	28
3.5.2. Nanopartículas poliméricas .....	30
3.5.3. Lipossomos .....	31
3.5.4. Nanoemulsões.....	33
4. Perspectivas do trabalho.....	37
5. Considerações finais .....	38
6. Segurança em laboratório .....	39
7. Referências .....	40

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas dos principais AAF. ....	16
Figura 2. Estruturas dos terpenos encontrados como constituintes majoritários em plantas da família Lamiaceae que apresentam atividade contra <i>C. albicans</i> reportada na literatura .....	22
Figura 3. Representação esquemática do processo de encapsulação do timol em diferentes sistemas que podem ser utilizados no combate ao <i>C. albicans</i> . ....	26
Figura 4. Esquema ilustrando a formação de micelas poliméricas a partir de copolímeros em bloco (tribloco) em solução. ....	30
Figura 5. Representação de uma nanopartícula polimérica. ....	31
Figura 6. Representação ilustrativa das diferentes possibilidades de organização dos lipossomos. ....	32
Figura 7. Esquema ilustrando os fenômenos de desestabilização de emulsões O/A e as suas relações .....	34
Figura 8. Representação de estruturas micelares.....	35

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características das principais infecções fúngicas ao redor do mundo. ....	11
Tabela 2. Estruturas de compostos pertencentes aos principais grupos que compõem os óleos essenciais e fontes comuns de onde são extraídos. ....	20
Tabela 3. Algumas nanoestruturas e suas características. ....	28
Tabela 4. Exemplificação de segmentos poliméricos hidrofóbicos e hidrofílicos de copolímeros utilizados na formação de micelas poliméricas, assim como, suas estruturas. ....	29

## LISTA DE ABREVIATURAS

AAF – Agentes antifúngicos

CH – Colesterol

CMC – Concentração micelar crítica

CVV – Candidíase vulvovaginal

CVVR – Candidíase vulvovaginal recorrente

DPPC – Dipalmitoilfosfatidilcolina

FDA – *Food and Drug Administration*

GI – Gastro-intestinal

GRAS – *Generally Recognized as Safe* (reconhecidos como seguros)

MIC – *Minimal inhibitory concentration* (concentração inibitória mínima)

MO – Micro-organismos

MSP – Metabólitos secundários de(as) plantas

NP – Nanopartículas

NE – Nanoemulsões

OE – Óleos essenciais

PC – Fosfatidilcolina

PG – Fosfatidilglicerol

Qts – Quitosana

TMC – Temperatura micelar crítica

## RESUMO

A crescente incidência de infecções fúngicas, juntamente ao aparecimento de espécies/cepas de fungos resistentes aos medicamentos comumente receitados no tratamento, justifica o crescente número de estudos visando desenvolver novas estratégias de tratamento mais eficazes. *Candida spp.* são os principais patógenos causadores de infecções fúngicas ao redor do mundo, sendo a *C. albicans* a espécie mais comum. As candidíases superficiais (mucosas) são os tipos de infecções mais comuns. Já as candidíases invasivas estão atreladas a altas taxas de mortalidade e acometem principalmente pacientes imunocomprometidos. O número de relatos de resistência a medicamentos como o Fluconazol e a Anfotericina B, que compõe a linha de frente dos tratamentos convencionais, também vem aumentando. Assim, a busca por novos agentes antifúngicos se faz necessária.

Neste panorama, estudos envolvendo metabólitos secundários de plantas como agentes antifúngicos, tanto na forma de óleos essenciais como de seus derivados isolados, têm se mostrado uma alternativa interessante para combater estas infecções. O potencial de ação reportado *in vitro* para alguns destes metabólitos é bastante promissor, pois são eficazes até contra biofilmes. No entanto, as características físico-químicas destas substâncias geram alguns desafios frente a sua aplicação *in vivo*.

Desta forma, sua incorporação em sistemas nanoestruturados é interessante, devido ao fato destes proporcionarem maior estabilidade ao ativo e aumentar sua biodisponibilidade através da sua encapsulação em nanopartículas. O tamanho nanométrico destas nanopartículas providencia um melhor perfil de distribuição do ativo no tecido, devido à alta área superficial atrelada a estes sistemas, e ainda facilita a sua penetração no meio intracelular.

Este trabalho apresenta uma breve revisão sobre esta problemática. Destaca também, a proposta de um sistema contendo um composto de origem natural encapsulado em nanopartículas com caráter mucoadesivo, visando aplicação no tratamento de candidíases superficiais (mucosas). A confecção e caracterização deste sistema seria o trabalho de conclusão de curso a ser desenvolvido para o curso de graduação em Química, que foi interrompido devido a pandemia de Covid-19.

*Palavras-chave: Candida albicans, óleos essenciais, timol, nanoemulsões.*

## 1. Introdução

O aumento nos casos de infecções fúngicas ao redor do mundo, juntamente ao aparecimento de espécies/cepas de fungos que apresentam algum tipo de resistência aos medicamentos comumente empregados têm incentivado estudos que buscam por potenciais agentes antifúngicos (AAF) mais eficazes e novas estratégias de tratamento.

Os principais patógenos causadores de micoses são do gênero *Candida spp.*, sendo a *C. albicans* a espécie mais comum. As candidíases superficiais estão entre as infecções mais comuns e as candidíases invasivas estão atreladas a altas taxas de mortalidade. Os mecanismos de resistência desenvolvidos por estes microorganismos já são descritos na literatura e são utilizados para auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias de tratamento mais eficazes a partir de novos AAF. Estes novos AAF devem agir preferencialmente através de mecanismos diferenciados a fim de contornar esse problema de resistência.

Dentro desta perspectiva, uma das soluções que tem se destacado nas últimas décadas, é a utilização de metabólitos secundários de plantas (MSP), na forma de óleos essenciais (OE) ou de seus derivados isolados. Estes compostos apresentam alta atividade biológica e inclusive podem ser utilizados em combinação com os fármacos existentes com a finalidade de resgatar a sua eficácia.

Diversos estudos têm explorado o potencial antimicrobiano destes metabólitos, trazendo resultados bastante promissores frente a sua utilização como AAF. Os resultados reportados na literatura indicam que diversos destes metabólitos são adequados para tratar o problema de resistência, tendo em vista que o seu mecanismo de ação envolve interferir em uma série de processos metabólicos do fungo, juntamente à desestruturação da célula (membrana), e se mostram eficazes até mesmo contra biofilmes. Contudo, apesar de estudos *in vitro* confirmarem esta eficácia, mais estudos direcionados *in vivo* ainda são necessários.

Entretanto, as características estruturais e as propriedades físico-químicas destes compostos, que estão intimamente ligadas ao seu mecanismo de ação, também são responsáveis pela sua instabilidade e baixa biodisponibilidade em meio fisiológico. Portanto, sua aplicação *in vivo* traz alguns desafios.



Desta maneira, a aplicação da nanotecnologia, particularmente no setor farmacêutico, já vem sendo utilizada para transpor estes desafios. Já são encontradas na literatura diversas estratégias para resolver problemas de estabilidade e biodisponibilidade destes metabólitos. Estas estratégias envolvem a encapsulação destes compostos em dispersões coloidais, onde o ativo pode ser protegido em nanopartículas (NP).

Dentre as características proporcionadas por estes sistemas, estão a: melhora no perfil de distribuição do ativo no tecido alvo, proporcionado pelo tamanho nanométrico das partículas que facilitam a penetração nos tecidos, inclusive através da membrana celular; maior estabilidade do ativo em meio fisiológico e conseqüentemente maior biodisponibilidade, necessitando assim de menores doses a serem administradas, visto que é evitada a sua degradação; redução da toxicidade do ativo; e a liberação controlada e localizada.

Alguns dos sistemas comumente utilizados para estes fins são as micelas poliméricas, NP poliméricas, lipossomos e nanoemulsões. Estes sistemas compõem uma das melhores alternativas para novas estratégias de tratamentos, pois podem ser produzidos através de diversas técnicas e já existem estudos comprovando a eficácia da utilização de MSP como AAF quando incorporados nestes sistemas. A confecção destes sistemas é baseada no emprego de novas tecnologias (nanotecnologia) sempre buscando utilizar insumos obtidos a partir de fontes naturais e renováveis.

Tratando-se de aplicações farmacêuticas, é necessário que os componentes destes sistemas apresentem baixa toxicidade (ou nenhuma se possível), sejam biocompatíveis e biodegradáveis.

Este trabalho tem como objetivo trazer uma breve revisão sobre a necessidade do desenvolvimento de novos AAF para o tratamento de candidíases nas mucosas, tendo como foco princípios ativos oriundos de fontes naturais como os MSP na forma de OE ou seus derivados isolados. Assim como, apresentar os sistemas comumente empregados para transpor os problemas de estabilidade, biodisponibilidade, toxicidade e liberação atrelados à utilização destes compostos naturais.

Finalmente, também é proposto o desenvolvimento de um sistema (NE) passível de aplicação para o tratamento de candidíases em mucosas, onde é encapsulado timol como AAF.

## **2. Objetivos**

### Objetivo geral:

Trazer uma breve revisão sobre a necessidade do desenvolvimento de novos AAF para o tratamento de candidíases nas mucosas, tendo como foco princípios ativos oriundos de fontes naturais como os MSP na forma de OE ou seus derivados isolados. Assim como, apresentar os sistemas comumente empregados para transpor os problemas de estabilidade, biodisponibilidade, toxicidade e liberação atrelados à utilização destes compostos naturais.

### Objetivos específicos:

- Trazer um levantamento sobre a incidência de infecções fúngicas e a necessidade do desenvolvimento de novos AAF baseado em novas substâncias que apresentem mecanismos de ação diferenciados para o tratamento de candidíases
- Descrever as características dos MSP como princípios ativos eficazes alternativos para tratar candidíases, tanto na forma de compostos isolados como em conjunto com os AAF comumente empregados.
- Apresentar alguns dos sistemas comumente empregados para transpor problemas de estabilidade, biodisponibilidade e possível toxicidade intrínsecos aos MSP.
- Propor o desenvolvimento de um sistema englobando o conteúdo que foi apresentado, como alternativa para a sua possível aplicação no tratamento de candidíases em mucosas.

### 3. Revisão da literatura

#### 3.1. Infecções fúngicas

Estima-se que doenças causadas por fungos afetam cerca de 1,7 bilhões de pessoas ao redor do mundo e as infecções invasivas são responsáveis por cerca de 1,5 milhões de mortes por ano, cerca de 3 vezes mais do que a malária.<sup>1,2</sup>

Vandeputte *et al.*<sup>3</sup> caracterizaram as principais infecções causadas por fungos ao redor do mundo, especificando os locais das infecções, assim como o tipo de patógeno, principais órgãos acometidos, o gênero do principal causador (espécies para as infecções invasivas) e a incidência estimada, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Características das principais infecções fúngicas ao redor do mundo.

Local no corpo	Tipo de patógeno	Órgão / tecido	Gênero mais frequente	Incidência estimada de infecções (global) casos/ano
Superficial	Primário	Pele e cabelos	<i>Malassezia</i> <i>Tricophyton</i>	~140.000.000
Cutâneo	Primário	Pele e unhas	<i>Epidermophyton</i> <i>Microsporum</i>	~1.500.000.000
Mucosa	Oportunista	Vagina, trato GI, trato urinário e olhos	<i>Candida spp.</i>  <i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i>	~135.000.000 ~9.500.000 ~1.000.000
Sistêmico	Oportunista	Qualquer órgão (pulmão, cérebro, sangue)	<i>Candida (C. albicans)</i> <i>Aspergillus fumigatus</i> Cryptococcus neoformans <i>Histoplasma capsulatum</i> <i>Pneumocystis jirovecii</i> Coccidioidomyces entre outros	>750.000 >300.000 ~225.000 ~100.000 >400.000 até 300.000

Fonte: Elaborado pelo autor. Adaptado de Firacative, 2020<sup>1</sup>, Vandeputte *et al.*, 2012<sup>3</sup> e The Fungal Infection Trust, 2016<sup>4</sup>.

Patógenos primários são aqueles naturalmente capazes de infectar um organismo saudável. Por outro lado, patógenos oportunistas podem ser encontrados na forma comensal (isto é, habita o hospedeiro sem causar danos à saúde) em organismos saudáveis e, somente após a transição para a forma patogênica, são capazes de colonizar o tecido afetado. Infecções localizadas causam desconforto local, entre outros sintomas dependendo da região afetada e, se não forem tratadas de maneira adequada, podem colonizar o tecido e evoluir para uma infecção invasiva, com sintomas que podem variar de uma febre comum à um choque séptico.<sup>3</sup>

A crescente incidência de infecções fúngicas nas últimas décadas está atrelada ao aparecimento de novas de cepas/espécies resistentes aos tratamentos convencionais, geralmente como resultado do uso indiscriminado de antibióticos com amplo espectro de atividade. Também, no caso das infecções invasivas, onde os mais afetados são pacientes imunocomprometidos, está atrelada ao aumento de terapias imunossupressoras disponíveis e a maior expectativa de vida dos pacientes devido aos avanços nos tratamentos. As infecções invasivas costumam acometer pacientes neoplásicos, pacientes com AIDS e portadores de HIV, diabéticos, receptores de transplante de órgãos, idosos e neonatos prematuros. As infecções mais severas costumam ocorrer em centros de tratamento intensivo e a estadia prolongada nestes centros é considerada um dos parâmetros etiológicos destas infecções.<sup>1,3,5-8</sup>

Como é possível observar na Tabela 1, os fungos do gênero *Candida* estão entre os principais agentes causadores de infecções sistêmicas e são de longe os mais comuns tratando-se de infecções nas mucosas. De fato, *Candida spp.* são responsáveis por cerca de 72% das infecções fúngicas causadas em ambiente hospitalar e cerca de 15% de todas as infecções nosocomiais e infecções hematogênicas.<sup>9</sup>

A candidíase (isto é, infecção causada por *Candida spp.*), quando na sua forma invasiva, está atrelada à altas taxas de mortalidade. A candidemia (isto é, infecção na corrente sanguínea causada por *Candida spp.*) nosocomial, apresenta uma taxa de mortalidade de cerca de 50% (global) e, apesar da carência de estudos mais representativos em regiões como a América Latina, os estudos existentes sugerem taxas de mortalidade muito maiores em países como o Brasil.<sup>6</sup>

O fato de que a maioria dos casos de candidíase mais severos acometem preferencialmente pacientes imunocomprometidos é reflexo da característica oportunística do fungo. Como citado anteriormente, essa patogenicidade oportunística do fungo deve-se à transição da sua forma comensal para a forma patogênica. As condições necessárias para essa transição estão atreladas à alguns fatores específico responsáveis pelo desbalanço do equilíbrio entre as atividades do sistema de defesa do hospedeiro, microbiota local e da presença do fungo, causadas por imunossupressão, deterioração da integridade da mucosa afetada e/ou a perturbação da microbiota local através do uso de antibióticos.<sup>7</sup>

*Candida spp.* são os principais causadores de infecções sistêmicas (por exemplo, candidemia) e micoses (por exemplo, candidíase vulvovaginal). Apesar da resistência à medicamentos estar atrelada predominantemente a outras espécies de *Candida* como *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii*, e a incidência destas espécies estar aumentando, o maior agente causador de candidíases ainda é o *Candida albicans*.<sup>10-12</sup>

Um estudo longitudinal analisou casos de infecção fúngica hospitalar dentro de uma janela de 12 anos (2003-2015) realizado no Rio Grande do Sul (o autor sugere que este foi o maior estudo deste tipo realizado na região sul do Brasil até a data da sua publicação) relata que, mais da metade das infecções reportadas (57,86%) eram infecções (superficiais) causadas por *Candida spp.*. Destas, mais de 90% eram *Candida albicans* (53,57% do total).<sup>13</sup>

No corpo humano, estes micro-organismos (MO) podem habitar diversos tecidos. O *C. albicans* é comumente encontrado na forma comensal em locais como a cavidade oral, trato gastro-intestinal (GI) e mucosa urogenital e estima-se que está presente nas mucosas de 2 em cada 3 humanos.<sup>10</sup> As altas taxas de mortalidade apresentadas remetem às infecções invasivas. No entanto, a incidência de infecções superficiais (micoses) é muito maior.<sup>14</sup>

A candidíase oral afeta cerca 2,5 milhões de indivíduos ao redor do mundo e costuma acometer principalmente usuários de próteses dentárias, pacientes neoplásicos sob tratamento radioterápico em regiões como a cabeça e o pescoço, assim como bebês, indivíduos inalando medicamentos esteróides para asma e 90%

de pacientes com HIV/AIDS não passando por tratamento antirretroviral quando necessário.<sup>4,15</sup>

Estima-se que a candidíase no esôfago afete cerca de 1,4 milhões de pessoas como 20% de pacientes com HIV/AIDS não passando por tratamento antirretroviral quando necessário, e dos que estão recebendo tratamento antirretroviral, 0,5% devem desenvolvê-la. Também afeta pacientes inalando medicamentos esteróides, diabéticos e outras condições imunodepressoras.<sup>4,16,17</sup>

A candidíase vulvovaginal (CVV) afeta cerca de 135 milhões de mulheres ao redor de mundo anualmente, onde cerca de 8% destas deve enfrentar mais de 4 episódios anuais, caracterizando como caso de CVV recorrente (CVVR). A CVV e principalmente a CVVR, afetam de maneira significativa a qualidade de vidas das mulheres acometidas, gerando substancial impacto negativo psicossocial, além do desconforto dos sintomas.<sup>4,11</sup> Estima-se que até 75% das mulheres experienciam CVV pelo menos uma vez ao longo de suas vidas e cerca de 45% das mulheres passam por pelo menos 2 episódios de CVV por ano. Um diagnóstico precoce e o tratamento adequado são cruciais para evitar posteriores complicações mais severas. No entanto, é uma tarefa difícil, visto que infecções fúngicas são geralmente subestimadas, possuem carência de programas de vigilância nos centros de saúde e se tratando de infecções invasivas o diagnóstico costuma ser tardio.<sup>18</sup>

A crescente incidência de infecções fúngicas nas últimas décadas e o aparecimento de novas cepas/espécies que apresentam alguma resistência aos tratamentos disponíveis, enfatizam a importância do desenvolvimento de novas estratégias de tratamentos.<sup>8,12,14,19-21</sup>

### **3.2. Resistência**

O próprio processo evolutivo via seleção natural permite que MO desenvolvam mecanismos de resistência aos medicamentos utilizados naturalmente e com relativa rapidez, permitindo que o fungo cresça e se espalhe na presença da droga.<sup>11,14</sup> Os diversos mecanismos de adaptação e resistência de *Candida spp.* às principais drogas disponíveis são extensamente descritos na literatura.<sup>3,8,10,14,20,22</sup>

A resposta destes MO à exposição a agente antifúngicos com efeitos fungistáticos (isto é, não matam o fungo, apenas suprimem seu crescimento e

propagação) e fungicidas (isto é, matam o fungo) pode ser via 3 mecanismos principais: reduzir a concentração efetiva da droga, alterações no alvo do medicamento e modificações no metabolismo.<sup>14</sup>

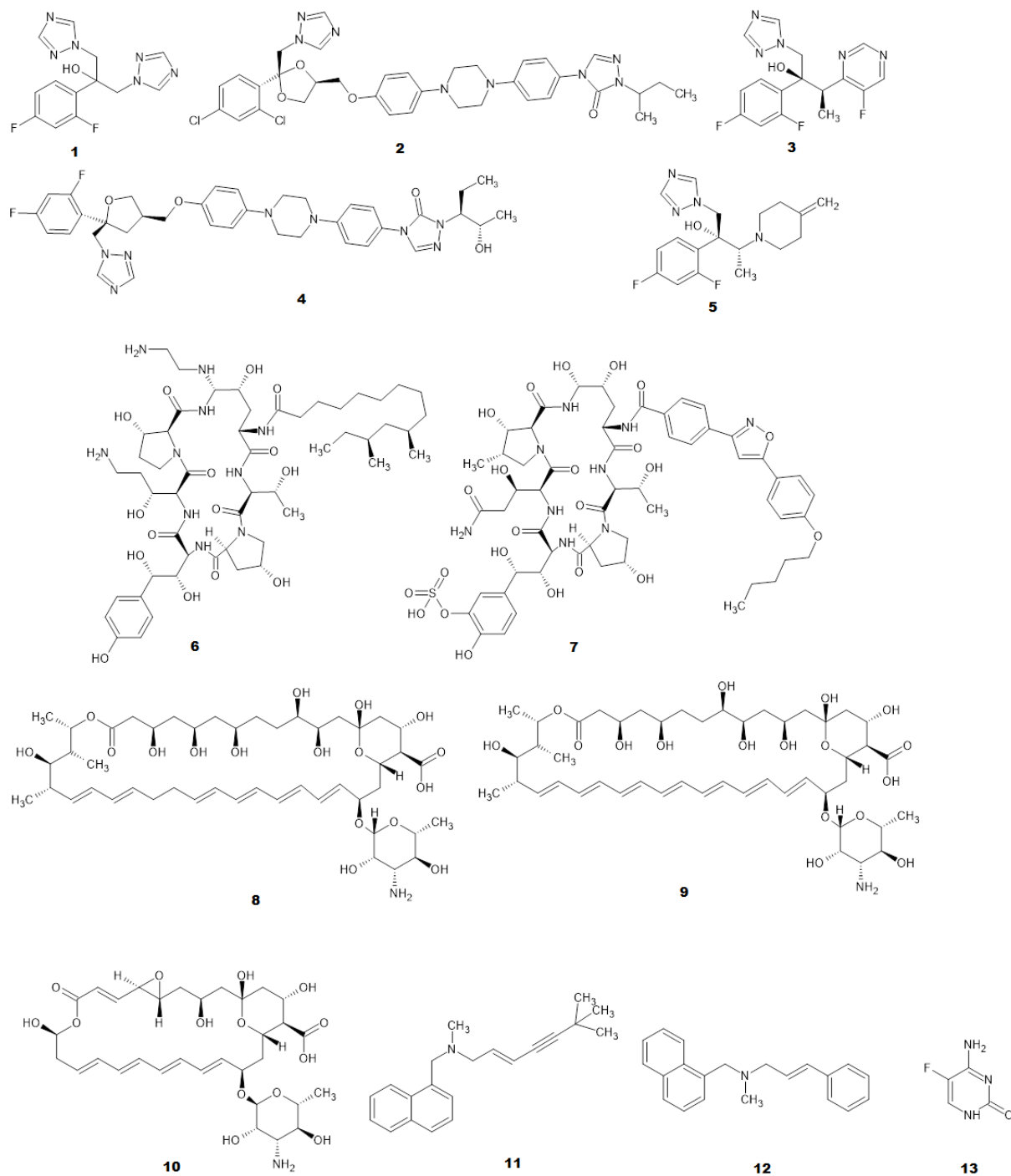
Dentre os diversos mecanismos de resistência e adaptação, a formação de biofilmes é um dos fatores mais preocupantes e um dos mais significativos atrelados ao aumento (em ordens de magnitude) da virulência da candidíase.<sup>9,22</sup> Biofilmes envolvem a formação de uma comunidade altamente organizada de células protegida por uma matriz polimérica composta de polissacarídeos, carboidratos e proteínas excretados pelo fungo, assim como uma mudança estrutural das suas células, que proporcionam maior adesão ao tecido, maior densidade de células, e facilita a propagação do MO no tecido infectado.<sup>9,14</sup> Estes e alguns outros fatores mais específicos (por exemplo, mudanças na composição dos esteróis da membrana, superexpressão das bombas de efluxo, entre outros) diminuem a susceptibilidade do fungo aos tratamentos convencionais, principalmente a drogas como os azóis e os polienos, que são a linha de frente no combate a candidiases.<sup>9,14,22</sup>

### **3.3. Agentes antifúngicos**

Os principais AAF disponíveis podem ser classificados de acordo com as suas estruturas, como azóis (triazóis) (Figura 1 **1-5**), equinocandinas (Figura. 1 **6-7**), polienos (Figura 1 **8-10**), alilaminas (Figura 1 **11-12**) e análogos de pirimidinas (Figura 1. **13**).<sup>8</sup>

Na Figura 1, são apresentadas as estruturas das principais drogas atualmente em uso para o tratamento de candidíase (superficial e sistêmica). Estes AAF também são utilizados para o tratamento de infecções causadas por outros fungos e são administrados de forma oral, tópica ou intravenosa dependendo do grau de toxicidade da droga e do tipo de infecção. Os principais mecanismos de ação destes AAF estão focados na interferência da síntese da parede celular do fungo (equinocandinas), atuar como inibidores da biossíntese de ergosterol (azóis e alilaminas), na síntese de ácidos nucleicos (flucitosina) ou como disruptores de membrana celular do fungo (polienos).<sup>14</sup>

Figura 1. Estruturas dos principais AAF. **1** Fluconazol, **2** Itraconazol, **3** Voriconazol, **4** Posaconazol, **5** Eflinaconazol, **6** Caspofungina, **7** Micafungina, **8** Nistatina, **9** Anfotericina B, **10** Natamicina, **11** Terbinafina, **12** Naftifina, **13** Flucitocina.



Fonte: Adaptado de Campoy *et al.*, 2017.<sup>14</sup>

Diferente das bactérias, os fungos são organismos eucariontes. Isso significa que nossas células compartilham de alguns potenciais alvos utilizados no combate a



estes MO, o que potencializa riscos de toxicidade de algumas drogas e impõe alguns desafios adicionais no desenvolvimento de novos AAF. Conseqüentemente, o número de AAF disponíveis é muito menor do que o de agentes antibacterianos, assim como a frequência em que novos AAF atingem o mercado.<sup>14</sup>

AAF da classe dos polienos como a Nistatina e a Anfotericina B (Figura 1 8, 9), são moléculas macrocíclicas de caráter anfifílico e, portanto, interagem com a bicamada lipídica da membrana celular do fungo complexando-se com os esteróis da membrana (principalmente o ergosterol) e formando poros. A formação destes poros leva à morte celular via a disrupção da membrana e o vazamento do material intracelular, assim como o a promoção de stress oxidativo dentro da célula. Polienos são caracterizados como agentes fungicidas.<sup>3,12,14</sup> Ambas possuem um grau de afinidade não negligenciável com o colesterol presente nas células humanas, devido a sua semelhança com o ergosterol (alvo do medicamento), que explica a toxicidade atrelada aos polienos. A Nistatina é comumente utilizada no tratamento de candidíases vaginal, cutânea e do esôfago e seu uso é apenas tópico, devido a sua toxicidade. A Anfotericina B é o medicamento mais comum receitado para o tratamento de candidíase sistêmica, é administrada por via intravenosa e apresenta alta toxicidade para os rins e fígado.<sup>12,14</sup>

Os AAF da classe dos azóis como o Fluconazol (triazol, Figura 1 1) são de longe os mais receitados e agem inibindo a atividade da enzima do citocromo P450 lanosterol 14 $\alpha$ -demetilase (CYP51), através da complexação com o átomo de ferro da protoporfirina em seu sítio ativo. Como resultado, é inibida a produção de ergosterol na membrana da célula e isso impede que a ela cresça e se reproduza. Azóis portanto, são medicamentos fungistáticos.<sup>3,12,14</sup>

As células de *C. albicans*, integrantes de biofilmes apresentam alta resistência aos azóis (principalmente o Fluconazol) e polienos (Anfotericina B).<sup>22</sup> É reportado também que a concentração inibitória mínima ou MIC (*Minimal inhibitory concentration*) necessária para tratar biofilmes com Anfotericina B é alta demais e, portanto, apresenta maior toxicidade. No caso da Anfotericina B, vale destacar que os efeitos de toxicidade costumam ser diminuídos via sua incorporação em sistemas coloidais como lipossomas.<sup>12</sup> Outro fator notável que proporciona melhor eficácia e

auxilia inclusive no reaproveitamento de alguns AAF já existentes, é a utilização de nanopartículas (NP).<sup>20</sup>

Novos AAF devem melhorar a farmacocinética e farmacodinâmica, reduzir/evitar efeitos de toxicidade e interações com outras drogas e atuar através de novos mecanismos de ação.<sup>14</sup>

Diversos dos AAF sob processo de aprovação são das classes discutidas acima e, portanto, compartilham dos mesmos mecanismos de ação. (Ver Tabela 1 em CAMPOY, 2017)<sup>14</sup> Desta forma, a busca por novos AAF (outras classes) e estratégias de tratamento diferentes contra candidíases se faz necessária. Neste âmbito, algumas alternativas naturais como óleos essenciais e seus derivados, reconhecidos por suas características antimicrobianas, têm atraído bastante atenção e já vem sendo estudados.<sup>2,9</sup>

### **3.3.1. Óleos essenciais**

Os OE são extratos vegetais obtidos a partir de diversos tecidos da planta como as flores, os frutos, a raiz, a casca, as folhas ou sementes, dependendo da espécie.<sup>23</sup> Sua utilização data de tempos muito antigos, onde eram utilizados desde práticas religiosas (por exemplo, como unções), à culinária e a confecção de formulações visando o bem-estar do indivíduo, devido às suas propriedades terapêuticas e organolépticas.<sup>24</sup> Atualmente costumam ser empregados em produtos alimentícios, cosméticos e farmacêuticos (por exemplo, conservantes, perfumes e medicamentos), e constituem um dos grupos mais importantes de matérias primas para estes setores da indústria.<sup>24</sup>

Biologicamente, estas misturas são compostas de metabólitos secundários de plantas (MSP) e possuem um papel importante na proteção contra agentes externos como predadores (herbívoros) e MO, assim como para atrair agentes polinizadores, através da sua atividade alelopática.<sup>21</sup>

Apesar da produção dos MSP envolver um gasto energético para a planta, durante muito tempo estes compostos passaram despercebidos por biólogos e botânicos por não apresentarem alguma relação direta evidente no crescimento e desenvolvimento da planta. No entanto, a partir de meados do séc. XIX, os MSP começaram a ser extensamente estudadas por químicos orgânicos, considerando a

sua vasta diversidade e complexidade estrutural. Desta maneira, a Química Orgânica contribuiu imensamente para o melhor entendimento das funções biológicas destes compostos e concomitantemente, estas descobertas impulsionaram o desenvolvimento de técnicas espectroscópicas e de separação, assim como metodologias sintéticas que agora constituem a base da Química Orgânica moderna.<sup>21</sup>

Biossinteticamente, como mostra a Tabela 2, estes compostos podem ser separados em 3 grupos principais, os terpenóides, os alcalóides e os fenilpropanóides, e cada um destes grupos apresenta atividade biológica através de uma variedade exuberante de estruturas e mecanismos de ação. De fato, uma descrição completa da variedade estrutural dos compostos de cada um dos grupos citados, assim como sua atividade biológica seria uma tarefa demasiadamente laboriosa e foge do escopo deste trabalho.<sup>21</sup>

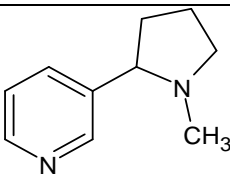
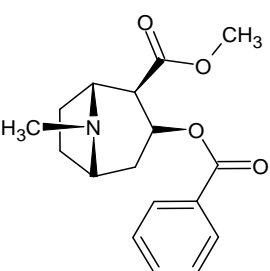
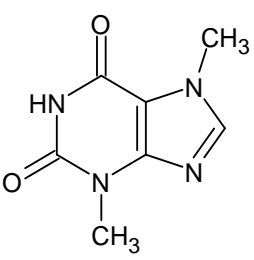
Radulovic *et al.*<sup>21</sup> publicaram um artigo de revisão trazendo uma discussão rica abordando os fatores estruturais relevantes a serem considerados para que um composto possua atividade biológica. Assim como, a farmacocinética (vias de administração, mecanismos de ação, e excreção), as limitações e perspectivas de estudos frente a utilização dos MSP como agentes antimicrobianos.

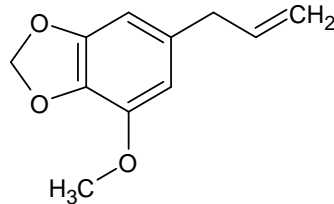
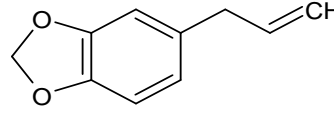
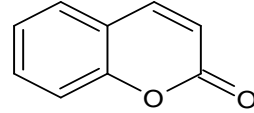
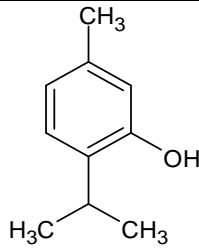
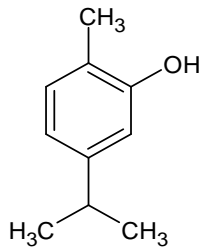
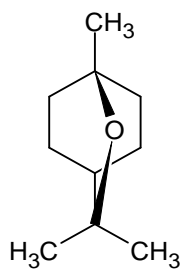
Neste estudo, Radulovic *et al.*<sup>21</sup> deixam claro o impacto que a estrutura dos MSP tem na sua atividade biológica, comenta que a eficácia destes metabólitos como agentes antimicrobianos deve-se à promiscuidade destas moléculas frente as interações que elas proporcionam na membrana celular e dentro da célula, diferente de fármacos que tem como alvo interferir em processos metabólicos específicos (por exemplo, os azóis). Em geral, isso proporciona uma variedade de possíveis mecanismos de ação antimicrobiana aos MSP e dificulta a resposta do MO. Desta forma, o potencial antimicrobiano pode ser potencializado quando estes metabólitos são utilizados em conjunto (e apresentam um efeito sinérgico), da mesma forma que a natureza o faz com os OE. Uma avaliação metodológica destes mecanismos e a complexidade deste efeito sinérgico ainda está na sua infância, tendo em vista a complexidade destas misturas e a possível inconsistência da sua composição, visto que plantas da mesma espécie podem produzir OE com seus constituintes em proporções diferentes devido à diferença de fatores geográficos, sazonais, e do

próprio desenvolvimento da planta ao longo de sua vida. Os autores citam um método de avaliação do potencial antimicrobiano dos MSP que envolve a fragmentação destas misturas, avaliação das propriedades e mecanismos de ação dos seus constituintes isolados e posterior confecção de misturas otimizadas. De fato, uma tarefa audaciosa e que, apesar dos desafios inerentes e envolver um trabalho multidisciplinar, deve ajudar a elucidar os mecanismos utilizados pelas plantas (aperfeiçoados através de gerações via seleção natural) para combater MO e auxiliar no desenvolvimento de novos fármacos a partir destes extratos.

A Tabela 2 apresenta algumas moléculas representantes de cada grupo citado anteriormente. Todas as estruturas apresentadas são conhecidas, extensamente estudadas e aplicadas conforme supracitado, por suas propriedades terapêuticas, organolépticas e antimicrobianas.

Tabela 2. Estruturas de compostos pertencentes aos principais grupos que compõem os óleos essenciais e fontes comuns de onde são extraídos.

Grupo	Nomenclatura	Estrutura	Origem comum
Alcalóides	Nicotina		<i>Nicotiana tabacum</i>
	Cocaína		<i>Erythroxylum coca</i>
	Teobromina		<i>Theobroma cacao</i>

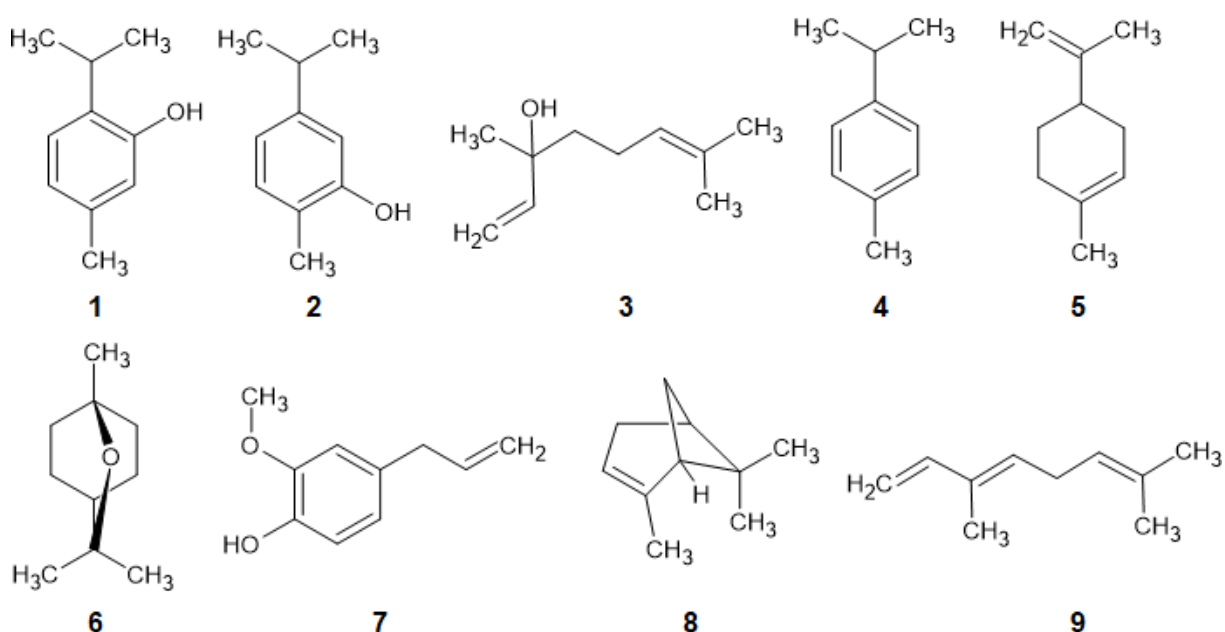
Fenilpropanóides	Miristicina		<i>Myristica fragrans</i>
	Safrol		<i>Ocotea odorifera</i>
	Cumarina		<i>Dipteryx odorata</i>
Terpenóides	Timol		<i>Thymus vulgaris</i>
	Carvacrol		<i>Origanum vulgare</i>
	Eucaliptol		<i>Eucalyptus globulus</i>

Fonte: Elaborado pelo autor.

Destes 3 grupos principais, os terpenóides são os mais abundantes e são os componentes majoritários dos OE. Já são conhecidas e catalogadas cerca de 60,000 estruturas diferentes.<sup>25</sup> Suas estruturas são derivadas da condensação de unidades monoméricas de 5 carbonos, o pirofosfato de isopentenila, uma versão natural do isopreno e sua biossíntese é pela via metabólica do mavelonato. Estas condensações geram terpenos com estruturas básicas geralmente monoterpenos (10 carbonos) e

sesquiterpenos (15 carbonos), que posteriormente podem formar estruturas mais elaboradas como estruturas aromáticas e também, incorporar grupos funcionais geralmente na forma de óxidos (por exemplo, álcoois, peróxidos, entre outros) como pode ser observado na Figura 2.<sup>21,24</sup>

Figura 2. Estruturas dos terpenos encontrados como constituintes majoritários em plantas da família Lamiaceae que apresentam atividade contra *C. albicans* reportada na literatura. **1** timol, **2** carvacrol, **3** linalol, **4** *p*-cimeno, **5** limoneno, **6** eucaliptol (1,8-cineol), **7** eugenol, **8**  $\alpha$ -pineno, **9**  $\beta$ -Ocimene.



Fonte: Elaborado pelo autor. Adaptado de Karpinski *et al.*<sup>2</sup>

Karpinski *et al.*<sup>2</sup> catalogaram diversas plantas pertencentes a família das Lamiaceae, reconhecidas por apresentarem atividade antifúngica (baseado em resultados de estudos anteriores), assim como apresentaram a composição (terpenóides) destas plantas. Das diversas plantas que aparecem no estudo, algumas apresentam atividade contra *C. albicans* com valores de MIC baixos o suficiente para aplicações de interesse farmacológico ( $<100 \mu\text{g mL}^{-1}$ )<sup>21</sup>. Destas, os terpenos encontrados como constituintes majoritários (até  $>15\%$ ) foram o timol (Figura 2 **1**), carvacrol (Figura 2 **2**), linalol (Figura 2 **3**), *p*-cimeno (Figura 2 **4**), limoneno (Figura 2 **5**), eucaliptol (Figura 2 **6**), eugenol (Figura 2 **7**),  $\alpha$ -pineno (Figura 2 **8**),  $\beta$ -ocimeno (Figura 2 **9**).

Algumas das plantas que compõem esta família são popularmente conhecidas como o tomilho (*Thymus vulgaris*), alecrim (*Salvia rosmarinus*), orégano (*Origanum*

*vulgare*), sálvia (*Salvia officinalis*) e hortelã (*Mentha piperita*), por exemplo. Já encontram aplicações em cremes dentais e enxaguantes bucais na forma de seus respectivos OE, ou como compostos isolados (por exemplo, timol, mentol, eucaliptol, linalol).<sup>2</sup>

Bona *et al.*<sup>26</sup> avaliaram a susceptibilidade de 30 cepas de *C. albicans* (a partir de amostras retiradas da mucosa vaginal) frente a uma variedade de 12 óleos essenciais (*Laurus nobilis*, *Pimpinella anisum*, *Thymus capitatus*, *Ocimum basilicum*, *Lavandula latifolia*, *Mentha spicata*, *Rosmarinus officinalis*, *Melaleuca alternifolia*, *Citrus paradisi* e *Satureja montana*). Os resultados apresentados neste estudo foram baseados nos valores de MIC obtidos através do método de microdiluição. Este estudo mostra a eficácia dos OE no combate às cepas resistentes à azóis (fungistáticos) e sugere um mecanismo de ação via disrupção da membrana e parede celular do fungo (fungicida). A atividade varia entre os OE devido às variações nas suas composições. Contudo, os 2 OE (*Satureja montana* e *Thymus capitatus*) que apresentaram atividade contra 100% das cepas testadas e os melhores resultados são óleos ricos em terpenos fenólicos como o carvacrol e o timol. Estes dois compostos já são reconhecidos e estudados por sua atividade antifúngica.<sup>27</sup> O autor também sugere que a eficácia da utilização de OE como AAF também é devida a ausência de mecanismos específicos de resistência frente a estes compostos, outro fator que motiva a utilização destes MSP como AAF.

Um estudo mais direcionado realizado por Kahn *et al.*<sup>28</sup> avaliou os efeitos do timol e carvacrol no sistema de defesa antioxidante do *Candida albicans*. A atividade enzimática responsável pelo sistema de defesa antioxidante do fungo está atrelada a fatores como a resistência à medicamentos como os azóis e os polienos, a morfogênese do fungo (formação de biofilmes) e a sua resposta a atividade imunológica. Os resultados deste estudo apontam que mesmo em baixas concentrações, a exposição a estes dois compostos induz o stress oxidativo na membrana celular do fungo através de uma série de reações envolvendo a oxidação dos componentes lipídicos responsáveis por manter a estrutura celular e controlar a sua permeabilidade, conseqüentemente levando à morte celular. Este estudo enfatiza a capacidade antifúngica destes terpenos e inclusive sugere sua utilização junto à AAF como o Fluconazol e Anfortericina B visando transpor os efeitos de resistência do *C. albicans* a estas drogas.

Outros estudos mostram a eficácia do OE de tomilho e do timol contra biofilmes de *C. albicans*. Um estudo realizado por Jafri *et al.*<sup>9</sup> mostrou a eficácia OE de tomilho (*Thymus vulgaris*) e do timol contra biofilmes de *C. albicans* e *C. tropicalis* a partir dos valores de MIC determinados no estudo. Também foi avaliada a combinação dos agentes naturais e destas duas drogas, onde ambos o OE de tomilho e o timol apresentaram uma interação sinérgica com o Fluconazol e a Anfotericina B e uma redução nos valores de MIC observados quando combinados. A atividade antifúngica dos OE e seus derivados está atrelada a presença de grupos funcionais como fenóis, aldeídos, cetonas, ésteres e álcoois.<sup>9</sup>

Alguns destes resultados vão ao encontro com as conclusões do trabalho de Radulovic *et al.*<sup>21</sup>, que sugere que a eficácia dos MSP no combate a MO está no fato da planta utilizá-los na forma de misturas complexas de compostos ativos, que trazem como vantagem o efeito sinérgico entre seus componentes, diferente de uma única substância com um alvo bem definido que proporciona ao MO a oportunidade do desenvolvimento de mecanismos de resistência com relativa rapidez, tendo em vista que há apenas um único mecanismo de ação envolvido.

Os estudos apresentados deixam claro a eficácia e o potencial dos OE e seus derivados isolados como AAF. No entanto, a maioria dos estudos trazem resultados em sistemas *in vitro*, e a aplicação de OE e seus derivados traz consigo alguns desafios, como a inerente instabilidade destas substâncias em meio fisiológico, tendo em vista as suas propriedades físico-químicas.

Quimicamente, os OE são misturas de compostos de baixa massa molecular, são voláteis, termolábeis, fotossensíveis e lipossolúveis. Diversas técnicas de extração podem ser empregadas para a obtenção de OE, as mais comuns são via destilação por arraste a vapor ou com CO<sub>2</sub> supercrítico.<sup>24</sup> A técnica escolhida depende principalmente da finalidade para a qual o OE será empregado (qualidade do extrato), e a caracterização costuma ser feita via técnica de cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (GC-MS).<sup>24</sup>

Analisando estas características físico-químicas, observa-se a natureza frágil dos OE frente ao seu processamento em nível industrial e os desafios atrelados a sua incorporação em sistemas que visem aplicação em meio fisiológico, como é o caso de formulações farmacêuticas.



Com base neste panorama, a utilização de formulações em sistemas coloidais surge como uma alternativa viável para aplicação de OE e seus derivados em meio fisiológico. Estes sistemas visam a encapsulação destes compostos em sistemas nanoestruturados, tais como nanopartículas (NP), que são capazes de aumentar a sua estabilidade de armazenamento e biodisponibilidade quando aplicados em mucosas evitando assim, sua rápida evaporação.<sup>23</sup>

### 3.3.2 Timol

Dentro da vasta diversidade de substâncias que compõem os OE da família das Lamiaceae, conforme citado anteriormente, um composto em particular chama atenção, o timol (Figura 2 1). O timol (2-isopropil-5-metilfenol) é um monoterpene fenólico, possui baixa solubilidade em meio aquoso ( $\log P = 3,4$ ), temperatura de fusão entre 48-51 °C e ebulição em 232 °C com pressão de vapor de 1mmHg (60 °C).<sup>29</sup>

É conhecido por ser um potente agente antimicrobiano, seu potencial medicinal já é estudado há décadas e alguns autores apontam que as propriedades como Log P e a presença do grupo fenólico são as principais propriedades responsáveis pela atividade biológica deste terpenóide, assim como de seus análogos (carvacrol, eugenol, mentol, entre outros)<sup>27</sup>

A excelente atividade do timol contra *C. albicans*, inclusive na forma de biofilmes, já é reportada em estudos *in vitro*.<sup>27</sup> Braga *et al.*<sup>30</sup> reportaram a capacidade do timol de interferir na adesão do fungo na mucosa (oral e vaginal) e sua capacidade de inibir a formação de biofilmes, assim como evitar que biofilmes maduros se propaguem. Esta capacidade de interferir na atividade metabólica de biofilmes é explicada pelo fato de o timol (assim como seus análogos terpênicos) agirem se alocando entre os componentes lipídicos da membrana, responsáveis por dar estrutura e controlar a permeabilidade da célula.<sup>30</sup>

A utilização de OE ricos em timol e também a sua forma isolada já encontra aplicações em cosméticos e alimentos. O timol, assim como o mentol e o eucaliptol são princípios ativos já comumente utilizados em enxaguantes bucais disponíveis comercialmente.<sup>27</sup>

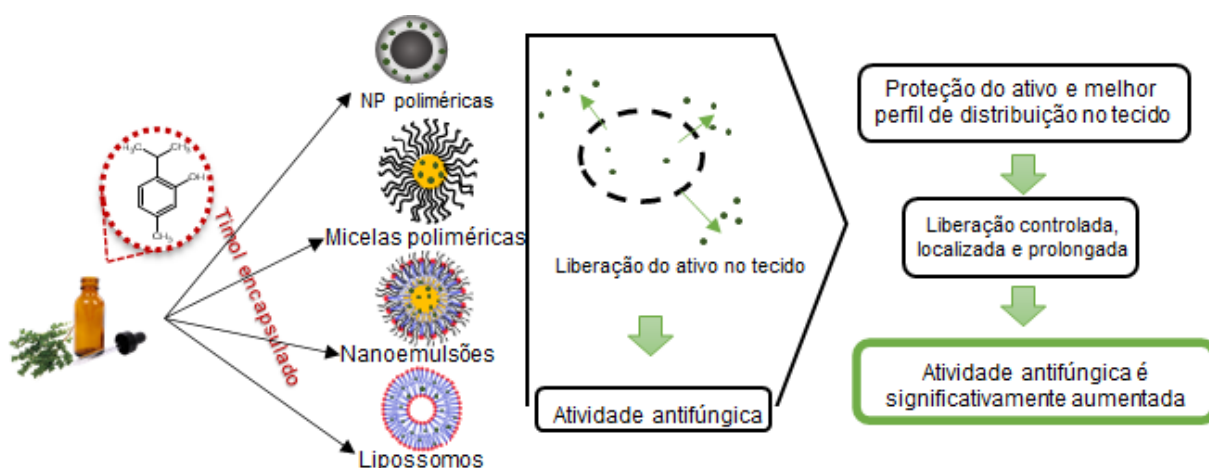
Atualmente, seu potencial como fármaco vem sendo extensamente explorado com resultados *in vitro* bastante promissores e, apesar da necessidade de mais

estudos que comprovem essa excelente atividade antimicrobiana *in vivo*. Alguns estudos também relatam que o timol pode ser citotóxico. Desta forma, sistemas de encapsulamento em NP devem ser a solução mais adequada, já que possibilitam transpor problemas de biodisponibilidade, estabilidade/liberação e toxicidade de diversas drogas.<sup>27</sup>

Atualmente, alguns estudos de formulações contendo timol em sistemas coloidais, já são encontrados na literatura.<sup>23,31-35</sup>

Alguns dos sistemas comumente utilizados são introduzidos no esquema da Figura 3 e suas características serão brevemente discutidas. Uma discussão mais aprofundada terá como foco apenas as nanoemulsões (NE).

Figura 3. Representação esquemática do processo de encapsulação do timol em diferentes sistemas que podem ser utilizados no combate ao *C. albicans*.



Fonte: Adaptado de Najafloo *et al.*, 2020<sup>23</sup>

### 3.4. Nanociência e nanotecnologia

Nanociência é o estudo de materiais com dimensões na escala nanométrica, onde  $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$ .<sup>36</sup> Uma definição convenientemente simples e abrangente é fornecida pelo Comitê Técnico 229 da Organização Internacional de Padronização de 2010 em nanotecnologias (ISO, 2010):

*“Aplicação do conhecimento científico para manipular e controlar a matéria em escala nanométrica e usufruir de propriedades e fenômenos dependentes da estrutura e do tamanho que diferem daquelas em escalas menores ou maiores.”*<sup>37</sup>

As implicações de alterar as propriedades físicas e químicas de um material influenciam diversas áreas da ciência e tecnologia.<sup>37</sup> Na medicina por exemplo, o constante desenvolvimento de novos medicamentos fitoterápicos e fitofármacos busca atender à crescente demanda por alternativas naturais aos produtos sintéticos já existentes no mercado. No entanto, as características físico-químicas destes extratos vegetais como a sua inerente instabilidade e baixa solubilidade em meio fisiológico costumam gerar desafios na sua aplicação com fármacos. Desta forma, a nanotecnologia vem revolucionando o setor, pois permite o desenvolvimento de sistemas emulsionados (coloides) utilizados para a encapsulação de ativos lipofílicos em nanopartículas (NP). Estas NP devem ser compostas de uma mistura de agentes emulsificantes e macromoléculas biocompatíveis. Estes sistemas carreadores de fármacos garantem a proteção do ativo contra sua degradação antes que este chegue no local de atividade e permitem modificar os parâmetros farmacocinéticos da droga, visando aumentar sua biodisponibilidade, sendo possível ainda funcionalizá-las agregando ao sistema capacidade de liberação controlada e localizada.<sup>38,39</sup>

Diversos sistemas nanoestruturados podem ser confeccionados para a incorporação de ativos, como por exemplo: micelas poliméricas, NP poliméricas, lipossomas, nanoemulsões, entre outros.<sup>38</sup> Estes nanocarreadores tem atraído a atenção no desenvolvimento de produtos em diversas áreas.<sup>40</sup> No desenvolvimento de produtos com aplicação farmacêutica, a encapsulação de fármacos com caráter lipofílico (como os OE e seus derivados) nestes sistemas agrega maior estabilidade ao ativo, viabiliza uma maior penetração e melhor distribuição no tecido epitelial, e facilita sua a difusão através da membrana celular.<sup>40</sup>

García *et al.*<sup>40</sup> traz em seu trabalho de revisão, diversos tipos de nanoestruturas que podem ser formadas, assim como, suas características e uma discussão rica em torno da aplicabilidade destes sistemas nos setores alimentício, agrícola e farmacêutico. Alguns dos sistemas são destacados na Tabela 3 e são introduzidos na próxima seção.

Tabela 3. Algumas nanoestruturas e suas características.

<b>Nanoestruturas</b>	<b>Características</b>	<b>Tamanhos</b>
<b>Micelas</b>	Formato predominantemente esférico, estrutura termodinamicamente favorecida <sup>41</sup>	10-100 nm
<b>Nanopartículas</b>	Apresentam diversos formatos	<300 nm
<b>Lipossomos</b>	Consistem em uma ou múltiplas bicamadas lipídicas concêntricas com um compartimento aquoso no seu interior	~200 nm
<b>Nanoemulsões</b>	Consiste em uma fase lipídica dispersa em uma fase contínua aquosa	40-400 nm

Fonte: Adaptado de García *et al.*<sup>40</sup>

### 3.5. Sistemas de liberação controlada de ativos

#### 3.5.1. Micelas poliméricas

Micelas poliméricas exploram a utilização de copolímeros em bloco para a encapsulação de ativos lipofílicos visando aumentar sua biodisponibilidade e trazem consigo a vantagem de permitir uma liberação controlada devido ao caráter dinâmico da sua estrutura.<sup>41</sup> Estes copolímeros devem possuir caráter anfifílico (isto é, possuir um segmento hidrofóbico e outro(s) hidrofílico(s)) e, portanto, permite a auto-organização em meio aquoso formando micelas esféricas com um núcleo hidrofóbico responsável por solubilizar o ativo e modular a sua liberação através de interações hidrofóbicas, e uma casca hidrofílica que facilita a sua dispersão em meio aquoso.<sup>41</sup>

Os copolímeros em bloco comumente empregados têm a forma (A-B, dibloco) ou (A-B-A, tribloco). Estas macromoléculas podem ser produzidas a partir de segmentos poliméricos de acordo com a finalidade de interesse. Os polímeros empregados nestes sistemas devem ser biocompatíveis e atóxicos e costuma ser de interesse farmacológico o emprego de polímeros com status *GRAS* (*Generally recognized as safe*) concedido pelo FDA.<sup>41</sup>

O segmento hidrofóbico pode ser composto de poliéteres, poliésteres, entre outros. Alguns exemplos são o polipropilenoglicol (PPO) e o poliácido láctico (PLA),

respectivamente. Alguns dos segmentos hidrofílicos comumente utilizados no design destes copolímeros são polímeros de caráter não-iônico como o polietilenoglicol (PEO) ou polissacarídeos como as dextranas e a quitosana (Qts).<sup>41</sup> As estruturas dos segmentos poliméricos citados são apresentadas na Tabela 4.

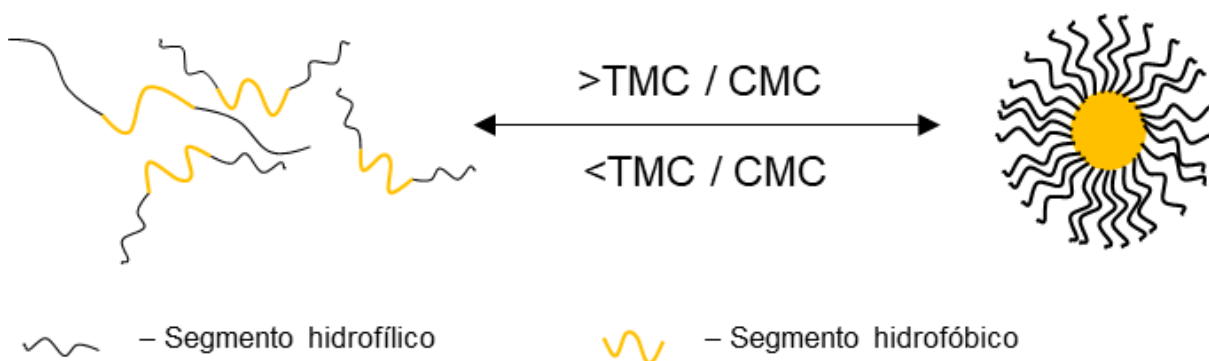
Tabela 4. Exemplificação de segmentos poliméricos hidrofóbicos e hidrofílicos de copolímeros utilizados na formação de micelas poliméricas, assim como, suas estruturas.

Segmento	Polímeros	Estruturas
Hidrofóbico	PPO	
	PLA	
Hidrofílico	PEO	
	Polissacarídeos (Qts)	

Fonte: Elaborado pelo autor.

No trabalho de Enumo Jr<sup>42</sup>, foi avaliada a interação de um componente de origem natural, a curcumina, em diferentes solventes com dois copolímeros (tribloco) do tipo Pluronic®, o sistema formado envolve uma estrutura micelar polimérica semelhante à da Figura 4. Estes copolímeros são comumente utilizados em formulações deste tipo e tem uma estrutura básica composta de um segmento hidrofóbico central e dois segmentos hidrofílicos em ambas extremidades. Os copolímeros avaliados (F127 e P123) apresentam uma formula geral (PEO)<sub>x</sub>(PPO)<sub>y</sub>(PEO)<sub>z</sub>, onde, para o P123, x = z = 20 e y = 70 e, para o F127, x = z = 100 e y = 70.<sup>42</sup>

Figura 4. Esquema ilustrando a formação de micelas poliméricas a partir de copolímeros em bloco (tribloco) em solução.



Fonte: Elaborada pelo autor. Adaptado de Enumo Jr, 2020.<sup>42</sup>

Vale ressaltar aqui, que o emprego de polissacarídeos como a Qts em formulações farmacêuticas apresenta a vantagem de possuir caráter mucoadesivo, devido a possibilidade da protonação dos grupos amino em meio ácido, que confere à sua estrutura um caráter de polieletrólito catiônico.<sup>29,43</sup> Esta propriedade é de grande interesse para formulações que visam aplicações tópicas como pomadas, cremes e géis, por exemplo. A Qts é de fato um dos biopolímeros mais atraentes quando se trata da confecção de nanocompósitos, devido às suas características, que vão além da mucoadesividade, biocompatibilidade e biodegradabilidade, como propriedades terapêuticas e funcionais (dentro do escopo farmacológico). Além disso, ela deriva de fontes renováveis, a partir da desacetilação de um dos biopolímeros mais abundantes do planeta, a quitina.<sup>44</sup>

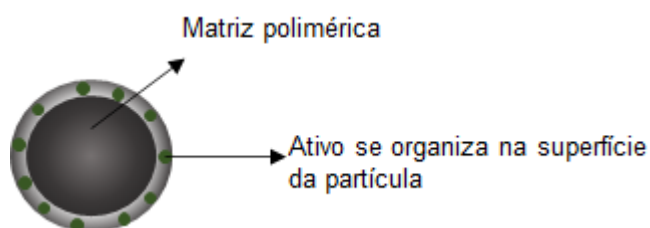
Estas micelas poliméricas são termodinamicamente favorecidas e tendem a se auto-organizarem em solução, mesmo na ausência do ativo lipofílico.<sup>41</sup> O estudo de Hwang *et al.*<sup>41</sup>, traz diversos exemplos de formulações que utilizam desta estratégia para melhorar o perfil farmacocinético de ativos lipofílicos. Um exemplo é uma formulação onde foi encapsulado Itraconazol em micelas poliméricas (PEO-b-PCL) para tratar *C. albicans* e reportou melhorias no perfil de distribuição da droga no tecido alvo.

### 3.5.2. Nanopartículas poliméricas

As NP poliméricas diferem das micelas poliméricas na sua forma de organização e confecção. Estas estruturas podem ser divididas em dois tipos principais, NP inorgânicas, orgânicas, ou uma mistura das duas. As NP inorgânicas

geralmente são compostas de óxidos de metais ou de metais puros. As NP orgânicas podem ser compostas de macromoléculas orgânicas como os polissacarídeos ou polímeros sintéticos e podem apresentar-se no formato de micelas alongadas, dendrímeros, estruturas lamelares, entre outras. (Figura 5) Estas estruturas podem ser preparadas a partir de duas abordagens diferentes, que também são aplicáveis à outras nanoestruturas, classificadas como top-down e bottom-up. A abordagem top-down leva à redução de tamanho do material através da aplicação de forças disruptivas. A abordagem bottom-up envolve o arranjo da nanoestrutura a partir da mistura de seus constituintes separados, com ou sem a aplicação de forças externas.<sup>40</sup> Da abordagem bottom-up, um método de preparo de NP poliméricas que se destaca é a nanoprecipitação.<sup>45</sup> Outros métodos que podem ser citados são a gelificação iônica, coacervação, entre outros.<sup>44</sup>

Figura 5. Representação de uma nanopartícula polimérica.



Fonte: Elaborado pelo autor. Adaptado de Najafloo *et al.*, 2020<sup>23</sup>

As NP compostas de polissacarídeos tem atraído o interesse do setor farmacêutico para a encapsulação de fármacos devido às diversas vantagens citadas anteriormente e aqui, novamente, a Qts se destaca.<sup>45</sup> No trabalho de Sanches *et al.*<sup>46</sup>, NP compostas de um complexo polieletrólítico de alginato e Qts foram obtidas através do método de gelificação iônica para encapsular OE de citronela. Este sistema apresenta atividade repelente contra insetos, característica dos terpenos presentes no óleo.

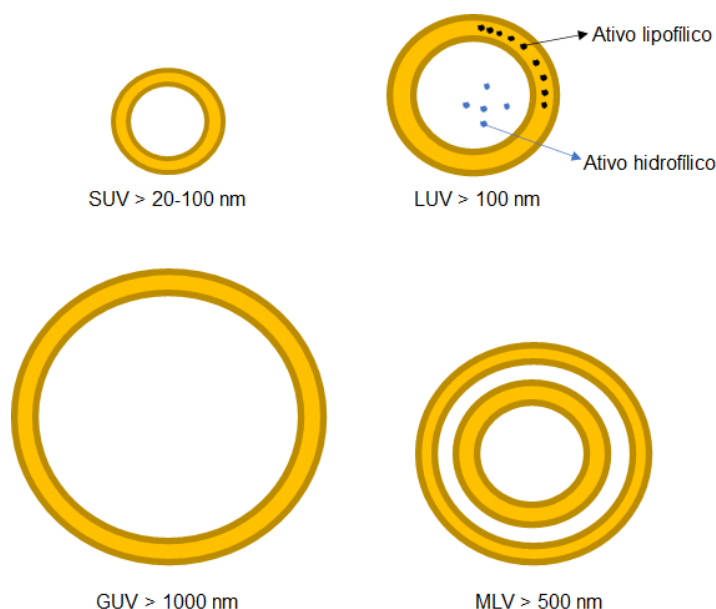
### 3.5.3. Lipossomos

Os lipossomos também são ótimos carreadores de fármacos, são biocompatíveis, biodegradáveis, atóxicos, não-imunogênicos e possibilitam a liberação controlada e localizada do ativo.<sup>47</sup> Sua confecção é geralmente a partir de compostos naturais como a fosfatidilcolina (PC), fosfatidilglicerol (PG), dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), colesterol (CH), estearilamina, entre outros. Suas

propriedades dependem majoritariamente da composição lipídica, presença de carga na superfície e o método de preparo.<sup>48</sup>

Um pouco diferente das outras estruturas citadas, estas dispersões coloidais são compostas de estruturas vesiculares com uma ou mais bicamadas lipídicas e o mesmo número de compartimentos aquosos. (Figura 6) Podem, portanto, encapsular ativos com diferentes características de solubilidade. Também devido à sua composição (isto é, fosfolipídios como a PC ou esteróides), interações com o material da membrana celular são favorecidas, o que torna os lipossomos veículos bastante versáteis.<sup>48</sup>

Figura 6. Representação ilustrativa das diferentes possibilidades de organização dos lipossomos. SUV = vesícula unilamelar pequena. LUV = vesícula unilamelar grande, GUV = vesícula unilamelar gigante, MLV = vesícula multilamelar.



Fonte: Elaborado pelo autor. Adaptado de Kumar *et al.*<sup>47</sup>

Como citado anteriormente, lipossomos já são uma alternativa utilizada para o melhoramento da ação de AAF como a Anfotericina B.<sup>48</sup> Existe uma grande variedade de técnicas de preparo de lipossomos e Maja *et al.* trazem um trabalho de revisão onde são comentados os principais métodos de preparo destas formulações, suas aplicações e ainda traz uma discussão das vantagens da utilização de métodos envolvendo fluidos supercríticos.

As limitações dos lipossomos estão em torno da sua baixa estabilidade e baixa resistência às condições fisiológicas como o pH gástrico e atividade enzimática.<sup>47</sup> No



entanto, estes problemas podem ser facilmente transpostos com o recobrimento destas estruturas com biopolímeros como a Qts.<sup>47</sup> Também deve ser controlado o tipo e a concentração do(s) fosfolípido(s) utilizado(s), visto que estes parâmetros influenciam na capacidade de encapsulação do fármaco, na sua liberação, na estabilidade do sistema e devem ser escolhidos de acordo com a finalidade desejada, juntamente com as propriedades do ativo.<sup>49</sup>

É possível encontrar na literatura estudos envolvendo a encapsulação de MSP como o timol e carvacrol em lipossomos e os benefícios atrelados a sua utilização como carreadores já é bastante explorada com finalidade antimicrobiana.<sup>50–52</sup> Atualmente, diversos trabalhos avaliando a eficácia de AAF naturais como os MSP para o tratamento de *C. albicans* (inclusive com resultados promissores contra biofilmes) podem ser encontrados.<sup>53</sup> Com isso em vista, a utilização dos sistemas apresentados torna-se uma ferramenta fundamental nesta tarefa.

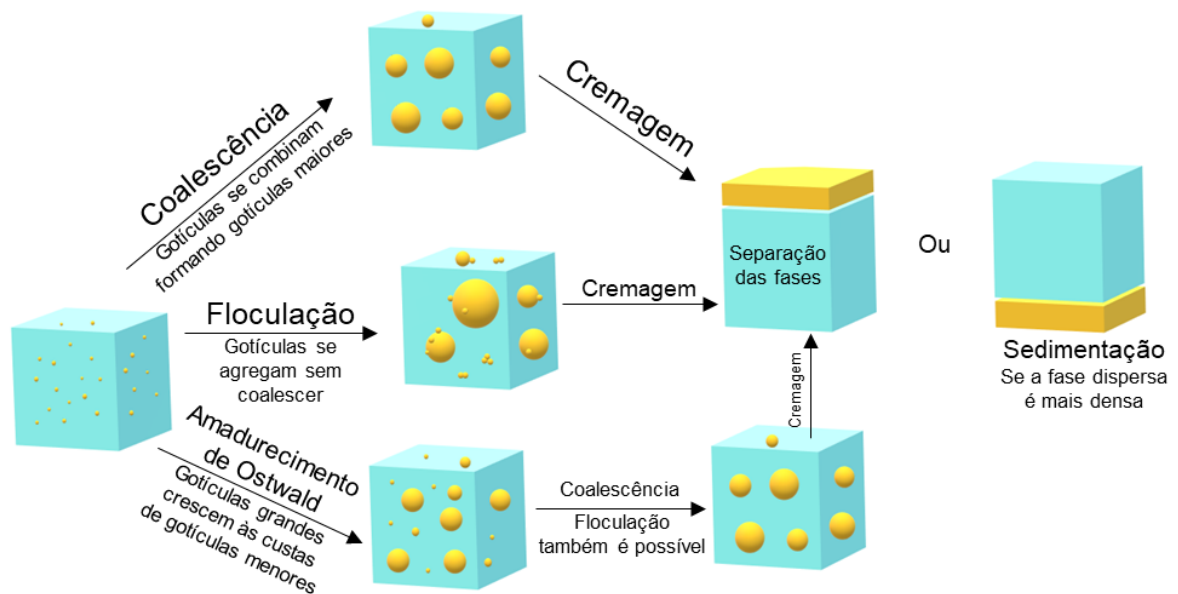
#### **3.5.4. Nanoemulsões**

As NE são dispersões geralmente bifásicas de dois líquidos imiscíveis estabilizadas por um surfactante, podendo ser do tipo água-em-óleo (A/O) onde gotículas de água formam a fase dispersa em uma fase contínua oleosa, ou óleo-em-água (O/A), onde o inverso é verdadeiro, ou seja, a fase dispersa é oleosa e a fase contínua é a água.<sup>54</sup> Comercialmente é muito comum o desenvolvimento de NE com o objetivo de encapsular compostos lipofílicos e dispersá-los em meio aquoso. Portanto, considerando que emulsões do tipo A/O ainda tenham utilidade na indústria, os sistemas do tipo O/A costumam ser mais estudados.<sup>55</sup> Estes sistemas são produzidos através do emprego de elevada tensão de cisalhamento e são cineticamente estabilizados com a utilização de surfactantes, polímeros ou outros estabilizantes que diminuem a tensão interfacial entre as fases.<sup>56</sup>

Alguns paralelos entre as NE e emulsões convencionais podem ser traçados. Basicamente as NE são como emulsões convencionais com gotículas na escala nanométrica, geralmente menor que 500 nm. Isso confere a elas um aspecto claro ou levemente leitoso, diferente das emulsões convencionais que são opacas devido ao maior espalhamento da luz causado pelas partículas maiores (efeito Tyndall).<sup>54,57,58</sup> Já os fenômenos responsáveis pela sua desestabilização são os mesmos em ambas,

e podem ser classificados como fenômenos gravitacionais e de coalescência. O esquema da Figura 7 ilustra estes fenômenos e mostra como eles estão relacionados.

Figura 7. Esquema ilustrando os fenômenos de desestabilização de emulsões O/A e as suas relações.



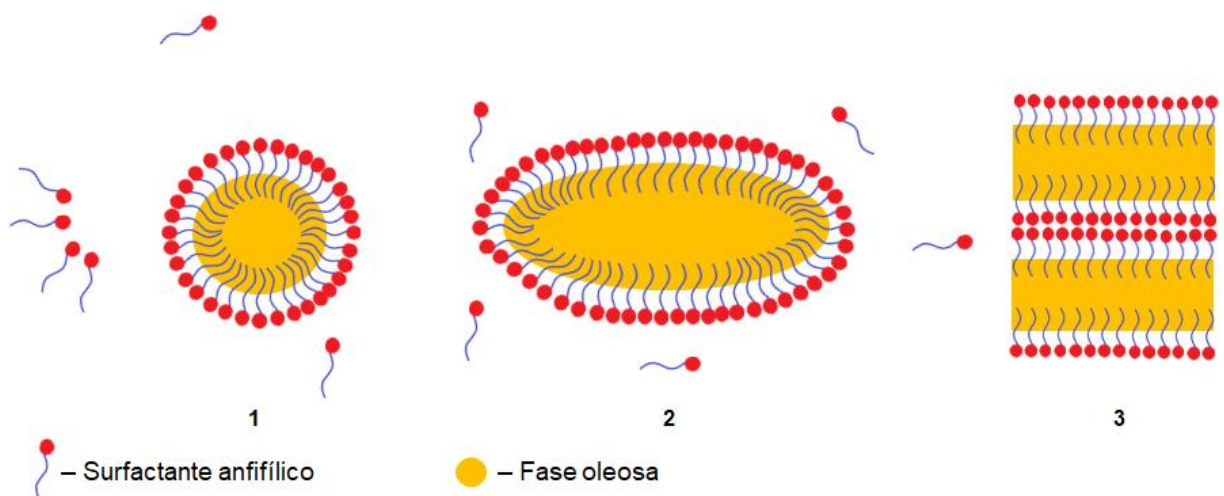
Fonte: Elaborado pelo autor. Adaptado de Gupta *et al.*, 2016.<sup>59</sup>

A força gravitacional tende a separar os componentes pela diferença de densidade e os fenômenos gravitacionais são: a sedimentação, onde partículas mais densas que o meio dispersante, sedimentam no fundo; e a cremação, onde as partículas menos densas que o meio dispersante se movem para cima e levam a separação das fases. Já os fenômenos de coalescência são: a floculação, onde partículas “grudam” umas nas outras e formam agregados maiores (as partículas mantem sua integridade individual); a própria coalescência de partículas pequenas que formam partículas maiores visando diminuir a elevada energia livre superficial associada às partículas menores; e o amadurecimento de Ostwald, onde partículas maiores crescem às custas de partículas menores devido ao transporte de massa da fase dispersa através da fase contínua, este fenômeno é mais pronunciado quanto maior for a dispersão nos tamanhos de partícula.<sup>55,60</sup>

Diferente das emulsões convencionais, devido às suas dimensões, a cinética de desestabilização de uma NE pode ser tão lenta que alguns autores as consideram como sistemas metaestáveis.<sup>58</sup> A estabilidade de um sistema emulsionado refere-se ao grau de separação visual das fases e com o uso de agentes emulsificantes adequados é possível produzir NE que permanecem estáveis de minutos a anos. Teoricamente é possível preparar uma NE sem um surfactante, porém na prática ela seria altamente instável quanto ao fenômeno de coalescência das gotículas. Portanto, se faz necessário o uso de um, ou geralmente uma combinação de surfactantes para garantir a estabilidade cinética durante e após o preparo.<sup>55</sup> Um surfactante ou agente emulsificante é uma molécula anfifílica e possui afinidade tanto pela fase oleosa como pela fase aquosa, logo, em solução tende a rapidamente organizar-se na interface óleo-água diminuindo a energia livre interfacial. Este processo facilita a ruptura das gotículas durante o processo de emulsificação, providencia uma estabilização estérica e/ou eletrostática (dependendo da natureza do surfactante), ajuda a contornar problemas envolvendo a coalescência e retarda o amadurecimento de Ostwald.<sup>54,58,60,61</sup>

Nas partículas em uma NE O/A, o surfactante solubiliza um composto lipofílico com a cauda apolar voltada para o centro da gotícula e a cabeça polar facilita a solubilização da micela na fase aquosa. As estruturas das micelas formadas podem ser esféricas, alongadas, lamelares ou bicontínuas.<sup>55</sup> (Figura 8)

Figura 8. Representação de estruturas micelares. **1** micela esférica, **2** micela alongada, **3** micela lamelar.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Um parâmetro chave na escolha dos componentes (surfactantes) adequados para a formulação de uma NE é o balanço hidrofílico-lipofílico ou HLB (*Hydrophilic Lipophilic Balance*), uma vez que a combinação de surfactantes empregada é essencial para garantir a formação e estabilidade do sistema. O HLB é um indicador da afinidade relativa entre as fases aquosa e oleosa de um agente emulsificante e descreve a razão de grupos hidrofílicos para grupos lipofílicos na molécula. Na literatura encontra-se diversos valores diferentes, mas basicamente um HLB >10 reflete uma maior afinidade pela fase aquosa e um HLB <10 uma maior afinidade pela fase oleosa. Essa escala foi criada para classificar surfactantes não iônicos de acordo com as suas propriedades emulsificantes, que por sua vez estão relacionadas à sua estrutura molecular, onde diferentes proporções das partes hidrofílicas ou lipofílicas da molécula levam a diferentes características de solubilidade e comportamento na interface.<sup>56,57,60</sup>

#### **3.5.4.1. Métodos de obtenção das NE**

Os métodos de obtenção de NEs podem ser classificadas como de alta energia e baixa energia (ou uma combinação dos dois). O método de emulsificação de alta energia consiste basicamente da utilização de instrumentos que proporcionam energia suficiente para criar forças disruptivas capazes de deformar e quebrar gotículas micrométricas em gotículas nanométricas que são estabilizadas pela adsorção de um surfactante à sua superfície. Essa elevada tensão de cisalhamento é obtida através de ultrassom, microfluidizadores ou homogeneização a alta pressão. Este método é industrialmente escalonável, porém envolve elevado custo de energia e equipamentos.<sup>54,62</sup>

O método de baixa energia faz uso da energia liberada pelo sistema durante o processo de diluição na fase contínua. Nele estão compreendidos: os métodos de inversão de fase por temperatura (PIT) ou composição (PIC), onde a solubilidade do surfactante é alterada empregando uma mudança de temperatura ou da composição do sistema, respectivamente<sup>63</sup>; e o método de emulsificação espontânea. Este último método consiste na adição em uma fase aquosa, de uma fase orgânica composta de um solvente miscível em água contendo um surfactante “lipofílico” e o princípio ativo de interesse. Esta fase orgânica é adicionada lentamente em uma fase aquosa contendo um surfactante “hidrofílico”.<sup>54,57</sup> Dessa forma, ocorre a migração instantânea

do solvente orgânico miscível para a fase aquosa, devido à diferença de tensão superficial e gradiente de concentração, causando uma turbulência no sistema, gerando assim, gotículas de escala nanométrica (compostas pelo surfactante “lipofílico” compreendendo o ativo) que são rapidamente estabilizadas pelo surfactante “hidrofílico” presente na fase aquosa.<sup>63</sup>

O método de emulsificação espontânea é atraente, pois não faz uso de equipamentos caros e emprego de temperatura, podendo incorporar fármacos termolábeis e também é industrialmente escalonável.<sup>29,56</sup>

É possível encontrar estudos incorporando ativos naturais em NE para tratar infecções causadas por *C. albicans*.<sup>35,64,65</sup> Li *et al.*<sup>35</sup> confeccionaram e caracterizaram alguns sistemas nanoemulsionados contendo timol obtidos via o método de emulsificação espontânea envolvendo o emprego de 2 surfactantes não-iônicos e avaliaram a susceptibilidade de alguns patógenos, incluindo o *C. albicans*, frente a sua exposição às formulações desenvolvidas. Os resultados reportados sugerem que o sistema apresenta características antimicrobianas promissoras para a utilização como produtos na forma de sprays, aerossol e formulações líquidas.

#### **4. Perspectivas do trabalho**

Tendo em vista a revisão abordada até este momento, juntamente com a problemática atrelada a pandemia, é proposto como continuidade deste estudo, o desenvolvimento de um sistema coloidal para a encapsulação do timol, visando sua aplicação para o tratamento de candidíase em mucosas. O sistema a ser desenvolvido baseia-se em uma NE, composta de lecitina (PC) e um surfactante não-iônico (P123) e posterior recobrimento com um biopolímero (Qts).

Estes constituintes possuem *status GRAS* e agregam ao ativo, maior estabilidade, proteção contra degradação em meio fisiológico e proporcionam ao sistema, mucoadesão, melhor perfil de distribuição do ativo no tecido, liberação controlada e a possibilidade de produzir um material seco a partir da sua secagem via processo de spray-drying.

A confecção da NE proposta se dá via a técnica de emulsificação espontânea, uma técnica simples e conveniente para encapsular ativos frágeis como os MSP, barata e escalonável para produção comercial.

Este sistema é baseado no estudo de Saatkamp<sup>29</sup>, onde diversas formulações de NE carreadoras de timol foram desenvolvidas buscando a otimização da estabilidade do sistema, visando aplicação para o tratamento de candidíase na cavidade oral, com algumas modificações. No estudo proposto também deve ser avaliada a eficiência de encapsulação do timol, assim como um estudo de liberação do ativo através de testes *in vitro*, permeabilidade do fármaco em mucosas e testes de atividade microbiológica.

## **5. Considerações finais**

O potencial farmacológico dos MSP vem sendo extensamente estudado nas últimas décadas frente a sua utilização como agentes antimicrobianos. Existem diversos estudos comprovando sua eficácia para o tratamento de infecções causadas por diversos MO e seu potencial contra candidíases promete o desenvolvimento de novos AAF capazes de combater até biofilmes. Os desafios encontrados na aplicação destas substâncias podem ser transpostos via sua incorporação em sistemas coloidais como micelas, NP, lipossomos e NE. Ainda há muitos fatores a serem otimizados nestes sistemas (considerando sua estabilidade) e elucidados frente aos mecanismos de ação destes metabólitos em MO como o *C. albicans*.

Neste âmbito, é proposto um estudo envolvendo a encapsulação de timol em uma NE que envolve os principais métodos de encapsulação e liberação de fármacos, agregando particularidades de lipossomos, NP e micelas. Os constituintes desta NE envolvem um surfactante não-iônico com função estabilizante, um fosfolípido (PC) na forma de lecitina como material encapsulante e um recobrimento polimérico de Qts com a finalidade de agregar estabilidade e caráter mucoadesivo ao sistema. Este sistema deve proporcionar maior estabilidade ao timol, permitir sua liberação localizada e controlada, e melhorar o perfil de distribuição do ativo no tecido alvo (mucosa).

## **6. Segurança em laboratório**

Este estudo apresenta uma revisão da literatura acerca central das infecções fúngicas (com foco nas candidíases superficiais) e estratégias de tratamento para este tipo de doença a partir de compostos naturais. O estudo aborda a possibilidade de desenvolver sistemas capazes de incorporar óleos essenciais e avaliar sua atividade no tratamento da doença. Todos os sistemas usados para esta finalidade são confeccionados a partir de insumos naturais e biocompatíveis, assim, quando houver emprego de solventes ou substâncias nocivas à saúde e ao meio ambiente, estes serão usados em quantidades reduzidas e serão descartados futuramente de modo adequado.

## 7. Referências

1. FIRACATIVE, C. Invasive fungal disease in humans: Are we aware of the real impact? **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 115, no. 9, p. 1–9, 2020. <https://doi.org/10.1590/0074-02760200430>.
2. KARPIŃSKI, T. M. Essential oils of lamiaceae family plants as antifungals. **Biomolecules**, vol. 10, no. 1, 2020. <https://doi.org/10.3390/biom10010103>.
3. VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A. T. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. **International Journal of Microbiology**, vol. 2012, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/713687>.
4. THE FUNGAL INFECTION. The Fungal Infection Trust. How common are fungal diseases? Fungal Research Trust 20th Anniversary meeting. London June 18th 2011, updated September 2016.”. no. September, 2016.
5. NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; TOBÓN, A. M.; RESTREPO, A.; COLOMBO, A. L. Epidemiology of opportunistic fungal infections in latin America. **Clinical Infectious Diseases**, vol. 51, no. 5, p. 561–570, 2010. <https://doi.org/10.1086/655683>.
6. DOI, A. M.; PIGNATARI, A. C. C.; EDMOND, M. B.; MARRA, A. R.; CAMARGO, L. F. A.; SIQUEIRA, R. A.; DA MOTA, V. P.; COLOMBO, A. L. Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a Brazilian national surveillance program. **PLoS ONE**, vol. 11, no. 1, p. 1–9, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146909>.
7. JACOBSEN, I. D.; NIEMIEC, M. J.; KAPITAN, M.; POLKE, M. Commensal to Pathogen Transition of *Candida albicans*. **Reference Module in Life Sciences**, 2020. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.21281-8>.
8. FUENTEFRIA, A. M.; PIPPI, B.; DALLA LANA, D. F.; DONATO, K. K.; DE ANDRADE, S. F. Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance. **Letters in Applied Microbiology**, vol. 66, no. 1, p. 2–13, 2018. <https://doi.org/10.1111/lam.12820>.
9. JAFRI, H.; AHMAD, I. *Thymus vulgaris* essential oil and thymol inhibit biofilms and interact synergistically with antifungal drugs against drug resistant strains of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. **Journal de Mycologie Medicale**, vol. 30, no. 1, p. 100911, 2020. DOI 10.1016/j.mycmed.2019.100911.
10. KUMAMOTO, C. A.; GRESNIGT, M. S.; HUBE, B. The gut, the bad and the harmless: *Candida albicans* as a commensal and opportunistic pathogen in the intestine. **Current Opinion in Microbiology**, vol. 56, p. 7–15, 2020. DOI 10.1016/j.mib.2020.05.006.
11. BASSYOUNI, R. H.; WALI, I. E.; KAMEL, Z.; KASSIM, M. F. Fennel oil: A promising antifungal agent against biofilm forming fluconazole resistant *Candida albicans* causing vulvovaginal candidiasis. **Journal of Herbal Medicine**, vol. 15, no. June 2018, p. 100227, 2019. DOI 10.1016/j.hermed.2018.08.002.
12. NAMI, S.; AGHEBATI-MALEKI, A.; MOROVATI, H.; AGHEBATI-MALEKI, L. Current antifungal drugs and immunotherapeutic approaches as promising strategies



to treatment of fungal diseases. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, vol. 110, no. November 2018, p. 857–868, 2019. DOI 10.1016/j.biopha.2018.12.009. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.009>.

13. FAY, V. da S.; GREGIANINI, T. S.; VEIGA, A. B. G. da; GONÇALVES, S. M. B.; RODRIGUES, D. M.; BONAMIGO, R. R. A 12-year study of fungal infections in Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Revista Iberoamericana de Micología**, vol. 36, no. 2, p. 55–60, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2018.10.006>.

14. CAMPOY, S.; ADRIO, J. L. Antifungals. **Biochemical Pharmacology**, vol. 133, p. 86–96, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.11.019>.

15. MONTON, C.; SETTHARAKSA, S.; SUKSAEREE, J.; CHUSUT, T. The preparation, characterization, and stability evaluation of a microemulsion-based oral spray containing clove oil for the treatment of oral candidiasis. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, vol. 57, no. November 2019, p. 101735, 2020. DOI 10.1016/j.jddst.2020.101735.

16. PECH, O. Esophageal Candidiasis. **Video Journal and Encyclopedia of GI Endoscopy**, vol. 1, no. 1, p. 64–65, 2013. DOI 10.1016/S2212-0971(13)70029-3.

17. HOVERSTEN, P.; OTAKI, F.; KATZKA, D. A. Course of Esophageal Candidiasis and Outcomes of Patients at a Single Center. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, vol. 17, no. 1, p. 200-202.e1, 2019. DOI 10.1016/j.cgh.2018.04.035.

18. MINOOEIANHAGHIGHI, M. H.; SEPEHRIAN, L.; SHOKRI, H. Effets antifongiques des huiles essentielles de *Lavandula binaludensis* et *Cuminum cyminum* contre *Candida albicans* isolés de patientes atteintes de candidose vulvo-vaginale récidivante. **Journal de Mycologie Médicale**, vol. 27, no. 1, p. 65–71, 2017. DOI 10.1016/j.mycmed.2016.09.002.

19. CHAABANE, F.; GRAF, A.; JEQUIER, L.; COSTE, A. T. Review on Antifungal Resistance Mechanisms in the Emerging Pathogen *Candida auris*. **Frontiers in Microbiology**, vol. 10, no. November, p. 1–8, 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02788>.

20. SALCI, T. P.; NEGRI, M.; ABADIO, A. K. R.; SVIDZINSKI, T. I. E.; KIOSHIMA, É. S. Targeting *Candida* spp. to develop antifungal agents. **Drug Discovery Today**, vol. 23, no. 4, p. 802–814, 2018. DOI 10.1016/j.drudis.2018.01.003. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.01.003>.

21. RADULOVIC, N. S.; BLAGOJEVIC, P. D.; STOJANOVIC-RADIC, Z. Z.; STOJANOVIC, N. M. Antimicrobial Plant Metabolites: Structural Diversity and Mechanism of Action. **Current Medicinal Chemistry**, vol. 20, no. 7, p. 932–952, 2013. <https://doi.org/10.2174/0929867311320070008>.

22. WALL, G.; MONTELONGO-JAUREGUI, D.; VIDAL BONIFACIO, B.; LOPEZ-RIBOT, J. L.; UPPULURI, P. *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. **Current Opinion in Microbiology**, vol. 52, p. 1–6, 2019. DOI 10.1016/j.mib.2019.04.001.

23. NAJAFLOO, R.; BEHYARI, M.; IMANI, R.; NOUR, S. A mini-review of Thymol incorporated materials: Applications in antibacterial wound dressing. **Journal of Drug**

**Delivery Science and Technology**, vol. 60, no. August, p. 101904, 2020. DOI 10.1016/j.jddst.2020.101904.

24. ALMEIDA, M. B. de. Prospecção Tecnológica de Óleos Essenciais de Schinus terebinthifolius e Desenvolvimento de um Creme Vaginal à base de Ocimum basilicum para Tratamento de Candidíase. , p. 1–22, 2013.

25. AGATONOVIC-KUSTRIN, S.; MORTON, D. W. **The Current and Potential Therapeutic Uses of Parthenolide**. 1st ed. [S. l.]: Elsevier B.V., 2018. vol. 58, . DOI 10.1016/B978-0-444-64056-7.00003-9.

26. BONA, E.; CANTAMESSA, S.; PAVAN, M.; NOVELLO, G.; MASSA, N.; ROCCHETTI, A.; BERTA, G.; GAMALERO, E. Sensitivity of Candida albicans to essential oils: are they an alternative to antifungal agents? **Journal of Applied Microbiology**, vol. 121, no. 6, p. 1530–1545, 2016. <https://doi.org/10.1111/jam.13282>.

27. MARCHESE, A.; ORHAN, I. E.; DAGLIA, M.; BARBIERI, R.; DI LORENZO, A.; NABAVI, S. F.; GORTZI, O.; IZADI, M.; NABAVI, S. M. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. **Food Chemistry**, vol. 210, p. 402–414, 2016. DOI 10.1016/j.foodchem.2016.04.111. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.111>.

28. KHAN, A.; AHMAD, A.; AHMAD KHAN, L.; PADOA, C. J.; VAN VUUREN, S.; MANZOOR, N. Effect of two monoterpene phenols on antioxidant defense system in Candida albicans. **Microbial Pathogenesis**, vol. 80, p. 50–56, 2015. DOI 10.1016/j.micpath.2015.02.004.

29. SAATKAMP, R. H. **Desenvolvimento e caracterização de nanoemulsões revestidas por quitosana como carreadores de timol aplicadas a tratamentos de problemas da cavidade oral**. 2019. 91 f. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.

30. BRAGA, P. C.; CULICI, M.; ALFIERI, M.; DAL SASSO, M. Thymol inhibits Candida albicans biofilm formation and mature biofilm. **International Journal of Antimicrobial Agents**, vol. 31, no. 5, p. 472–477, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.12.013>.

31. GUARDA, A.; RUBILAR, J. F.; MILTZ, J.; GALOTTO, M. J. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. **International Journal of Food Microbiology**, vol. 146, no. 2, p. 144–150, 2011. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.011. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.011>.

32. RASSU, G.; NIEDDU, M.; BOSI, P.; TREVISI, P.; COLOMBO, M.; PRIORI, D.; MANCONI, P.; GIUNCHEDI, P.; GAVINI, E.; BOATTO, G. Encapsulation and modified-release of thymol from oral microparticles as adjuvant or substitute to current medications. **Phytomedicine**, vol. 21, no. 12, p. 1627–1632, 2014. DOI 10.1016/j.phymed.2014.07.017.

33. ROBLEDO, N.; VERA, P.; LÓPEZ, L.; YAZDANI-PEDRAM, M.; TAPIA, C.; ABUGOCH, L. Thymol nanoemulsions incorporated in quinoa protein/chitosan edible films; antifungal effect in cherry tomatoes. **Food Chemistry**, vol. 246, no. August 2017, p. 211–219, 2018. DOI 10.1016/j.foodchem.2017.11.032.

34. LI, X.; YANG, X.; DENG, H.; GUO, Y.; XUE, J. Gelatin films incorporated with thymol nanoemulsions: Physical properties and antimicrobial activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 150, p. 161–168, 2020. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2020.02.066.
35. LI, J.; CHANG, J. W.; SAENGER, M.; DEERING, A. Thymol nanoemulsions formed via spontaneous emulsification: Physical and antimicrobial properties. **Food Chemistry**, vol. 232, p. 191–197, 2017. DOI 10.1016/j.foodchem.2017.03.147.
36. BUSQUETS, R.; MBUNDI, L. **Concepts of Nanotechnology**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2017. DOI 10.1016/B978-0-323-42980-1.00001-7.
37. DAHMAN, Y. An Introduction to Nanotechnology\*\*By Yaser Dahman, Hok Heng Lo, and Mark Edney. **Nanotechnology and Functional Materials for Engineers**, , p. 1–17, 2017. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-51256-5.00001-0>.
38. ABOOFAZELI, R. Nanometric-scaled emulsions (nanoemulsions). **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, vol. 9, no. 4, p. 325–326, 2010. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2010.897>.
39. SHAH, P.; BHALODIA, D.; SHELAT, P. Nanoemulsion: A pharmaceutical review. **Systematic Reviews in Pharmacy**, vol. 1, no. 1, p. 24–32, 2010. <https://doi.org/10.4103/0975-8453.59509>.
40. ROBLES-GARCÍA, M. A.; RODRÍGUEZ-FÉLIX, F.; MÁRQUEZ-RÍOS, E.; AGUILAR, J. A.; BARRERA-RODRÍGUEZ, A.; AGUILAR, J.; RUIZ-CRUZ, S.; DEL-TORO-SÁNCHEZ, C. L. Applications of nanotechnology in the agriculture, food, and pharmaceuticals. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, vol. 16, no. 8, p. 8188–8207, 2016. <https://doi.org/10.1166/jnn.2016.12925>.
41. HWANG, D.; RAMSEY, J. D.; KABANOV, A. V. Polymeric micelles for the delivery of poorly soluble drugs: From nanoformulation to clinical approval. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2020. DOI 10.1016/j.addr.2020.09.009.
42. JUNIOR, A. E. **Desenvolvimento de fibras eletrofiadas de acetato de celulose recobertas com quitosana contendo curcumina aplicadas em tratamentos cutâneos**. 2020. 163 f. Universidade Federal de Santa Catarina, 2020.
43. PARIZE, A. L. **Desenvolvimento de sistemas microparticulados e de filmes a base de quitosana e corante natural cúrcuma**. 2009. 187 f. 2009. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806007105>.
44. ALI, A.; AHMED, S. A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 109, p. 273–286, 2018. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2017.12.078.
45. LUQUE-ALCARAZ, A. G.; LIZARDI-MENDOZA, J.; GOYCOOLEA, F. M.; HIGUERA-CIAPARA, I.; ARGÜELLES-MONAL, W. Preparation of chitosan nanoparticles by nanoprecipitation and their ability as a drug nanocarrier. **RSC Advances**, vol. 6, no. 64, p. 59250–59256, 2016. <https://doi.org/10.1039/c6ra06563e>.
46. SANCHES, M. P.; GROSS, I. P.; SAATKAMP, R. H.; PARIZE, A. L.; SOLDI, V. Chitosan-sodium alginate polyelectrolyte complex coating pluronic® F127 nanoparticles loaded with citronella essential oil. **Journal of the Brazilian Chemical**

**Society**, vol. 31, no. 4, p. 803–812, 2020. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190244>.

47. KUMAR, S.; DUTTA, J.; DUTTA, P. K.; KOH, J. A systematic study on chitosan-liposome based systems for biomedical applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 160, p. 470–481, 2020. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2020.05.192.

48. MAJA, L.; ŽELJKO, K.; MATEJA, P. Sustainable technologies for liposome preparation. **Journal of Supercritical Fluids**, vol. 165, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.104984>.

49. MARITIM, S.; BOULAS, P.; LIN, Y. Comprehensive Analysis of Liposome Formulation Parameters and their Influence on Encapsulation , Stability and Drug Release in Glibenclamide Liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, , p. 120051, 2020. DOI 10.1016/j.ijpharm.2020.120051.

50. LIOLIOS, C. C.; GORTZI, O.; LALAS, S.; TSAKNIS, J.; CHINOI, I. Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. **Food Chemistry**, vol. 112, no. 1, p. 77–83, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.060>.

51. ENGEL, J. B.; HECKLER, C.; TONDO, E. C.; DAROIT, D. J.; DA SILVA MALHEIROS, P. Antimicrobial activity of free and liposome-encapsulated thymol and carvacrol against *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* adhered to stainless steel. **International Journal of Food Microbiology**, vol. 252, no. November 2016, p. 18–23, 2017. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.04.003.

52. HECKLER, C.; MARQUES MADERS SILVA, C.; AYRES CACCIATORE, F.; DAROIT, D. J.; DA SILVA MALHEIROS, P. Thymol and carvacrol in nanoliposomes: Characterization and a comparison with free counterparts against planktonic and glass-adhered *Salmonella*. **Lwt**, vol. 127, no. March, p. 109382, 2020. DOI 10.1016/j.lwt.2020.109382.

53. ZIDA, A.; BAMBA, S.; YACOUBA, A.; OUEDRAOGO-TRAORE, R.; GUIGUEMDÉ, R. T. Substances naturelles actives sur *Candida albicans*, sources de nouveaux médicaments antifongiques : revue de la littérature. **Journal de Mycologie Medicale**, vol. 27, no. 1, p. 1–19, 2017. DOI 10.1016/j.mycmed.2016.10.002.

54. SINGH, Y.; MEHER, J. G.; RAVAL, K.; KHAN, F. A.; CHAURASIA, M.; JAIN, N. K.; CHOURASIA, M. K. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, vol. 252, p. 28–49, 2017. DOI 10.1016/j.jconrel.2017.03.008.

55. MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: Terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, vol. 8, no. 6, p. 1719–1729, 2012. <https://doi.org/10.1039/c2sm06903b>.

56. KLANG, V.; VALENTA, C. Lecithin-based nanoemulsions. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, vol. 21, no. 1, p. 55–76, 2011. DOI 10.1016/S1773-2247(11)50006-1.

57. BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: Solvent, oil and surfactant optimisation. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 280, no. 1–2, p. 241–251, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.05.016>.
58. ANTON, N.; VANDAMME, T. F. Nano-emulsions and micro-emulsions: Clarifications of the critical differences. **Pharmaceutical Research**, vol. 28, no. 5, p. 978–985, 2011. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0309-1>.
59. ANKUR GUPTA, H. BURAK ERAL, T. ALAN HATTON, P. S. D. Nanoemulsions: Formation, Properties and Applications. **Soft Matter**, no. 12, p. 2826–2841, 2016. DOI 10.1039/b000000x.
60. SALVIA-TRUJILLO, L.; SOLIVA-FORTUNY, R.; ROJAS-GRAÜ, M. A.; MCCLEMENTS, D. J.; MARTÍN-BELLOSO, O. Edible Nanoemulsions as Carriers of Active Ingredients: A Review. **Annual Review of Food Science and Technology**, vol. 8, no. 1, p. 439–466, 2017. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030216-025908>.
61. MCCLEMENTS, D. J. Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, vol. 47, no. 7, p. 611–649, 2007. <https://doi.org/10.1080/10408390701289292>.
62. A.NASEEMA, LOHITESH KOVOORU, ALOK KUMAR BEHERA, K.P. PRAMODH KUMAR, P. S. Advances in Colloid and Interface Science. **Advances in Colloid and Interface Science**, , p. 135938, 2020. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102318>.
63. SOLANS, C.; SOLÉ, I. Nano-emulsions: Formation by low-energy methods. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, vol. 17, no. 5, p. 246–254, 2012. DOI 10.1016/j.cocis.2012.07.003.
64. ADHAVAN, P.; KAUR, G.; PRINCY, A.; MURUGAN, R. Essential oil nanoemulsions of wild patchouli attenuate multi-drug resistant gram-positive, gram-negative and *Candida albicans*. **Industrial Crops and Products**, vol. 100, p. 106–116, 2017. DOI 10.1016/j.indcrop.2017.02.015.
65. GÜNDEL, S. da S.; DE GODOI, S. N.; SANTOS, R. C. V.; DA SILVA, J. T.; LEITE, L. B. de M.; AMARAL, A. C.; OURIQUE, A. F. In vivo antifungal activity of nanoemulsions containing eucalyptus or lemongrass essential oils in murine model of vulvovaginal candidiasis. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, vol. 57, no. April, p. 101762, 2020. DOI 10.1016/j.jddst.2020.101762.