



Universidade Federal do Pampa

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS URUGUAIANA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

Trabalho de Conclusão de Curso

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO
ANTIFÚNGICA DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO ITRACONAZOL
ASSOCIADO AO ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia***

RICIELE MOREIRA DE MORAIS

Uruguaiana/RS

2018

RICIELE MOREIRA DE MORAIS

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO
ANTIFÚNGICA DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO ITRACONAZOL
ASSOCIADO AO ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Farmácia da
Universidade Federal do Pampa, como
requisito parcial para obtenção do título
de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Letícia Marques Colomé

Co-orientadora: Cheila D.O. Stopiglia

Uruguaiana/RS

2018

Riciele Moreira de Moraes

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA
E AVALIAÇÃO ANTIFÚNGICA DE NANOPARTÍCULAS
CONTENDO ITRACONAZOL ASSOCIADO AO
ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia***

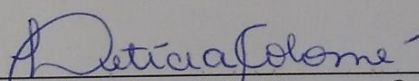
Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Farmácia da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), como requisito parcial para aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Letícia Marques Colomé

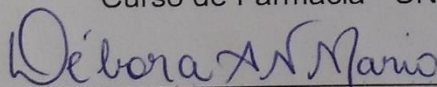
Área de concentração: Farmácia

Trabalho de conclusão de curso defendido e aprovado em: 02 / 07 / 2018

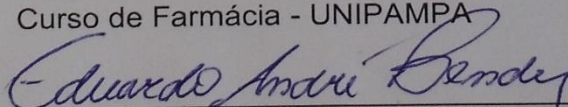
Banca examinadora:



Prof^a. Dr^a. Letícia Marques Colomé
Orientadora
Curso de Farmácia - UNIPAMPA



Prof^a. Dr^a. Débora Nunes Mario
Curso de Farmácia - UNIPAMPA



Prof. Dr. Eduardo André Bender
Curso de Farmácia - UNIPAMPA

AGRADECIMENTO

Agradeço a Nossa Senhora Aparecida e Jesus Cristo por estarem sempre junto comigo em todos os momentos da minha vida, iluminando meus caminhos e me abençoando sempre.

Aos meus pais Elio e Glenecir, por me apoiarem, fazerem o possível e o impossível para que eu alcance o que sempre almejo, como tornar-me Farmacêutica.

Aos meus irmãos Raissa e Rafael sou grata pelos incentivos, conversas e abraços (mesmo distantes) principalmente quando os obstáculos apareciam e o medo ousava tomar conta de mim.

Agradeço ao Robson, pelo companheirismo, paciência, pelas vindas à Uruguaiana quando eu estava com muitas provas, trabalhos e TCC para fazer. Obrigada negrinho por ser além de um namorado, um grande amigo.

Para que a concretização deste estudo se efetivasse: Agradeço a minha orientadora Profa. Letícia Marques Colomé, pela paciência para comigo, aguentando meus choros e minhas irresponsabilidades muitas vezes, pelo apoio e ensinamentos que serão essenciais em minha caminhada profissional.

Agradeço também a Profa. Cheila Stopiglia, por aceitar o convite de ser coorientadora deste trabalho, pelo apoio, ajuda e incansáveis conselhos em relação a este estudo e futuros trabalhos acadêmicos.

O meu muito obrigada a todos do Lab 105, começando pelo Gabriel, agradeço pela sua amizade, companheirismo e ajuda na concretização deste trabalho, ao Luiz e ao Pedro pela amizade e carinho de vocês, a Mariane e Renata pelas ajudas, conversas e risos no laboratório, fazendo com que aqueles momentos de apreensão tornassem momentos de alegria. "Só queremos NANO".

Ao querido e aconchegante Laboratório 211, onde bactérias e fungos predominam fazendo meus dias de tortura mais felizes. Agradeço a Greice, a Maria Fernanda e ao Anderson pelos incansáveis repiques, Tici obrigada pelas caronas e ajuda no preparo de materiais, a Gabi pela amizade, e a Téc. Tati pelo auxílio nas dúvidas e conselhos sobre as técnicas da tão amada microbiologia.

Obrigada aos laboratórios de Controle de Qualidade e LEFQPN (lab do Elton) pelo empréstimo dos equipamentos, que sem eles não teria como concluir os estudos.

RESUMO

A onicomicose pode ser causada por leveduras do gênero *Candida*, sendo de difícil tratamento. A terapia convencional pode ser tóxica e estar relacionada à resistência fúngica. As nanopartículas poliméricas são sistemas coloidais capazes de melhorar as propriedades de fármacos, bem como reverter a resistência fúngica. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar nanopartículas poliméricas com itraconazol (ITZ) associado ao óleo essencial de *M.alternifolia* (TTO) e avaliar o potencial antifúngico em isolados de *Candida* spp. O teste de inchamento de polímero foi realizado e indicou adequabilidade em nanopartículas de Poli (ϵ -caprolactona) (PCL), utilizando TTO. As nanopartículas foram obtidas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado, caracterizadas e testadas frente a isolados de *Candida* spp pela técnica de microdiluição em caldo. Foram realizados também o perfil de suscetibilidade de ITZ e o TTO isolados, e o método de *Checkerboard* para avaliar o efeito da associação de ITZ com TTO. A nanocápsula com ITZ associada ao TTO (NC-TTO ITZ) apresentou um diâmetro médio de 212nm, SPAN de 1,93 e pH de 5,90. A CIM do TTO-livre frente a *C. albicans* ATCC 28367 e *C. parapsilosis* ATCC 22019 foi de 37,5 $\mu\text{g/mL}$ e para *C.tropicalis* ATCC 750 foi de 18,75 $\mu\text{g/mL}$. A CIM do ITZ livre frente a todos os isolados testados foi $>16 \mu\text{g/mL}$. O teste da associação de TTO com ITZ frente a *Candida albicans* ATCC 28367 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019 teve como resultado indiferença ($0,5 < \text{ICIF} < 4$). O teste de suscetibilidade da NC-TTO ITZ, a todos os isolados de *Candida* testados, teve CIM $> 51,2\mu\text{g/mL}$ para TTO e $> 16 \mu\text{g/mL}$ para ITZ nos sistemas nanoparticulados, sugerindo que o TTO tem potencial contra leveduras, como *Candidas* spp. Assim, considera-se importante padronizar o desenvolvimento e a caracterização das nanopartículas, bem como as técnicas microbiológicas envolvendo TTO, itraconazol e fluconazol por ser o fármaco de primeira escolha para tratamento de determinadas infecções por *Candida* spp.

Palavras-Chaves: nanocápsulas poliméricas, nanoesferas, óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, itraconazol, *Candida* spp.

ABSTRACT

Onychomycosis can be caused by yeasts of the genus *Candida*, being difficult to treat. Conventional therapy may be toxic and related to fungal resistance. Polymeric nanoparticles are colloidal systems capable of enhancing drug properties as well as reversing fungal resistance. The objective of this work was to develop and characterize polymer nanoparticles with itraconazole (ITZ) associated with *M.alternifolia* essential oil (TTO) and evaluate the antifungal potential in *Candida* spp. The polymer swelling test was performed and indicated adequacy in poly (ϵ -caprolactone) (PCL) nanoparticles using TTO. The nanoparticles were obtained by the interfacial deposition method of the preformed polymer, characterized and tested against isolates of *Candida* spp by the technique of microdilution in broth. The susceptibility profile of ITZ and TTO alone was also performed, and the Checkerboard method was used to evaluate the effect of the association of ITZ with TTO. The nanocapsule with ITZ associated with TTO (NC-TTO ITZ) had an average diameter of 212nm, SPAN of 1.93 and pH of 5.90. The MIC of TTO-free against *C. albicans* ATCC 28367 and *C. parapsilosis* ATCC 22019 was 37,5 μ g/mL and for *C.tropicalis* ATCC 750 was 18,75 μ g / mL. The free ITZ MIC versus all tested isolates was > 16 μ g/mL. The test of the association of TTO with ITZ against *C.albicans* ATCC 28367 and *C. parapsilosis* ATCC 22019 resulted in indifference (0.5 <ICIF <4). The susceptibility test of NC-TTO ITZ to all *Candida* isolates tested had MIC > 51.2 μ g /mL for TTO and > 16 μ g/mL for ITZ in nanoparticulate systems, suggesting that TTO has potential against yeast, such as *Candidas* spp. Thus, it is considered important to standardize the development and characterization of the nanoparticles, as well as the microbiological techniques involving TTO, itraconazole and fluconazole because it is the drug of first choice for the treatment of certain infections by *Candida* spp.

Keywords: polymer nanocapsules, nanospheres, essential oil of *Melaleuca alternifolia*, itraconazole, *Candida* spp.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TTO - Tea Tre Oil / óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*

NE - Nanoesfera polimérica

NC - Nanocápsulas polimérica

AIDS / SIDA- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

PCL - poli (ϵ -caprolactona)

EUD - Eudragit RS100®

EHL - Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo

pH - Potencial hidrogênico

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Instituto

RPMI- Roswell Park Memorial Institute

MOPS - Ácido 3N-morfolino propanosulfônico

DMSO - Dimetilsulfóxido

UFC - Unidades Formadoras de Colônia

CIM - Concentração Inibitória Mínima

ICIF - Índice de concentração Inibitória Fracionada

ITZ - Itraconazol

FLZ - fluconazol

LSD - Least Significance Difference

C/ - Com

S/ - Sem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo geral	11
2.2 Objetivos específicos	11
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1 Candidíase	12
3.2 Onicomicose	13
3.3 Itraconazol	16
3.4 Óleos essenciais	17
3.4.1 Óleo de melaleuca	18
3.5 Nanopartículas poliméricas	19
4 MÉTODOS	20
4.1 Teste de inchamento / dissolução de filmes poliméricos	20
4.2 Preparo das Nanopartículas Poliméricas	20
4.3 Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo itraconazol	21
4.3.1 Determinação do diâmetro da partícula e polidispersão	21
4.3.2 Determinação do pH	21
4.3.3 Avaliação da atividade in vitro utilizando isolados de Candida spp.	22
4.3.4 Método Checkerboard	23
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1 Teste de inchamento/ dissolução dos filmes poliméricos	24
5.2 Preparo das Nanopartículas Poliméricas	27
5.3 Caracterização físico-química das suspensões de nanopartículas poliméricas contendo itraconazol com ou sem associação	28
5.3.1 Determinação do diâmetro da partícula e polidispersão	28
5.3.2 Determinação do pH	29
5.3.3 Avaliação da atividade in vitro utilizando isolados de Candida spp.	30
6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	34
7. REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

A candidíase é caracterizada como uma infecção fúngica causada pela levedura *Candida* spp. sendo a espécie *Candida albicans* a mais frequente (ALTHUS *et al.*, 2015; BANDEIRA *et al.*, 2017). Dentre as várias formas de classificação das doenças fúngicas causadas pelo gênero *Candida*, as infecções ungueais, como a onicomicose, merecem destaque, pois afetam tanto a população imunocompetente quanto os imunossuprimidos (PEIXOTO, 2014; PEREIRA, 2017). As onicomicoses são infecções fúngicas que acometem as unhas das mãos e dos pés. Sendo uma das infecções superficiais mais frequentes, possuem como principais agentes etiológicos os dermatófitos pertencentes aos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*, bem como leveduras, tais como *Candida albicans*, causando lesões no tecido ungueal, resultando na destruição da queratina associada com a resposta inflamatória (LAMB *et al.*, 2013; SCHERER, 2017). A onicomicose é uma infecção de difícil tratamento, que geralmente é direcionado a espécie fúngica envolvida, levando em consideração o grau de comprometimento da unha, possíveis efeitos colaterais e comorbidades do paciente, bem como pela eficácia, perfil de segurança e cinética dos medicamentos disponíveis (SCHERER, 2017; MAGAGNIN *et al.*, 2011).

Muitos fármacos de uso oral, como a terbinafina (TBR) e o itraconazol (ITZ) são eficazes no tratamento de onicomicoses, inclusive os causados por *Candida* spp. (VAGHASIYA *et al.*, 2013). Porém, apresentam em sua maior parte toxicidade, favorecem danos hepáticos, bem como interação com outros medicamentos e resistência microbiana (SCHERER, 2017; PEREIRA, 2017; MAGAGNIN *et al.*, 2011; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA, 2005). Os medicamentos de uso tópico, por sua vez, são mais seguros, mas apresentam a desvantagem do tempo de tratamento prolongado e da baixa eficácia terapêutica (5% a 12%), tendo em vista a dificuldade de penetração dos fármacos na estrutura da unha (SCHERER, 2017).

As plantas têm sido usadas como terapias alternativas ao longo dos séculos, devido suas vantagens em relação aos medicamentos sintéticos, como baixa resistência microbiana, biodegradabilidade e baixa toxicidade. Os óleos essenciais são bem conhecidos por suas propriedades antimicrobiana, antioxidantes,

antitumoral, entre outras, sendo requerido na indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética (NIKOLIC *et al.*, 2017).

O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* denominado “tea tree oil” (TTO), possui uma extensa atividade antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória e antifúngica (CARSON *et al.*, 2006; FLORES *et al.*, 2013). De acordo com Carson e colaboradores (2006); Oliveira e colaboradores (2011), a atividade antifúngica do TTO é frente a cepas de *Aspergillus* spp., *Sacharomyces cerevisiae* entre outros fungos, além de leveduras, como *Candida albicans* e *Candida glabrata*. A resistência antimicrobiana é difícil de ocorrer, devido aos vários constituintes do óleo essencial de TTO. No entanto, em formulações tópicas podem causar irritação da pele e seus componentes podem oxidar durante o armazenamento (CARSON *et al.*, 2006; FLORES *et al.*, 2013).

Dentre as estratégias que podem melhorar a eficácia do tratamento de doenças, reduzindo doses e até mesmo revertendo a resistência em cepas fúngicas é o desenvolvimento de formulações tecnológicas para veiculação de fármacos (MARTINS *et al.*, 2017), podendo-se destacar a encapsulação de fármacos em nanopartículas (JAGER *et al.*, 2015). Nanopartículas poliméricas são sistemas nanométricos classificados em: nanoesferas (NE) e nanocápsulas (NC). As nanoesferas são sistemas coloidais que não apresentam óleo em sua composição, sendo formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido (CODEVILLA *et al.*, 2015). Já as nanocápsulas poliméricas são sistemas carreadores que contém núcleo oleoso ou aquoso, cercado por uma membrana polimérica, onde o fármaco pode estar adsorvido ou dissolvido no núcleo (CODEVILLA *et al.*, 2015; JAGER *et al.*, 2009), podendo desse modo ser considerado como um sistema de reservatório (JAGER *et al.*, 2009). O uso de nanopartículas poliméricas em várias aplicações terapêuticas atribui-se por apresentarem inúmeras vantagens quando comparadas com o fármaco livre, tais como, redução dos efeitos adversos (toxicidade e irritação), melhorar a eficácia, a biodisponibilidade e o aumento da estabilidade de fármacos (LIU *et al.*, 2011). Assim, o desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas contendo ITZ associado ao TTO, tem chances de ser vantajoso, se tratando da entrega eficaz tanto do fármaco, quanto do óleo, afim de proporcionar aumento de biodisponibilidade, liberação controlada e possível potencialidade na atividade antifúngica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e caracterizar nanopartículas poliméricas contendo itraconazol (ITZ) associado ao óleo essencial de *M. alternifolia* (TTO) e avaliar seu potencial antifúngico contra leveduras causadoras de candidíase ungueal ou paroníquia e onicomicose.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver nanocápsulas poliméricas contendo itraconazol e óleo essencial de *M.alternifolia*;
- Caracterizar físico-quimicamente as suspensões de nanopartículas em termos de tamanho de partícula, polidispersão, e pH;
- Avaliar as suspensões de nanopartículas produzidas e os ativos livres frente a isolados de *Candida* spp.
- Verificar a existência de sinergismo entre o fármaco itraconazol com o óleo essencial *M.alternifolia* utilizado frente a isolados de *Candida* spp.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Candidíase

As leveduras do gênero *Candida* são constituídas de aproximadamente 200 espécies (PEIXOTO *et al.*, 2014; BENEDETTI *et al.*, 2016), das quais 20 são descritas como possíveis agentes etiológicos de candidíase: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. pelliculosa*, *C. rugosa*, *C. lusitaniae*, *C. kefyr*, *C. norvegensis*, *C. lipolytica* e *C. inconspicua* (YAPAR, 2014). As espécies de *Candida* spp. são comensais do homem, fazendo parte da microbiota normal da pele, do trato gastrointestinal e geniturinário humano (ALTHUS *et al.*, 2015; OLIVEIRA, 2014; BANDEIRA *et al.*, 2017). A ocorrência de mudanças nas condições saprofíticas dessa levedura surge devido a alguns desequilíbrios no mecanismo de defesa do hospedeiro, ou por fatores externos, como o uso de antimicrobianos, que colaboram para que esse microrganismo seja o agente etiológico de várias infecções fúngicas, incluindo onicomicoses, vaginites e candidíase (OLIVEIRA, 2014; PEREIRA, 2017).

A candidíase é caracterizada como a infecção fúngica causada pela levedura *Candida* spp., tendo como espécie mais frequente a *Candida albicans*, (ALTHUS *et al.*, 2015; BANDEIRA *et al.*, 2017; OLIVEIRA, 2014; PEDROSO *et al.*, 2014; LIMA *et al.*, 2006). Vários fatores podem servir de substrato ao desenvolvimento das doenças causadas por *Candida*: leucoses, câncer, tuberculose, cirrose hepática, hepatite epidêmica, mieloma múltiplo, antibioticoterapia, entre outros, mas as alterações mais importantes que favorecem a candidíase são Diabetes Mellitus e a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (OLIVEIRA, 2014; LIMA, 2006).

O fármaco de primeira linha recomendado para o tratamento da candidíase causada por *Candida albicans* entre outras espécies é o fluconazol (NG *et al.*, 2018). Porém o uso extensivo de fluconazol ao longo dos anos favoreceu para que espécies do gênero *Candida* mais comumente isoladas ficassem menos susceptíveis aos derivados azólicos, dificultando o tratamento da candidíase e de outras infecções causadas por leveduras (LIMA *et al.*, 2008; NG *et al.*, 2018; COLOMBO *et al.*, 2013).

As formas de manifestação da candidíase são basicamente de três tipos: I) a mucocutânea que acomete a cavidade oral e o canal vaginal; II) a candidíase cutânea que ocorre em áreas úmidas do corpo como espaços interdigitais, regiões das mamas, axilas, pregas das virilhas e unhas; e III) a candidíase sistêmica, denominada candidemia, ocorrendo em pacientes terminais com doenças debilitantes, neoplásicas, imunossupressivas e após transplantes de órgãos, podendo acometer diferentes órgãos e tecidos como: pulmões, meninges, rins, bexiga, articulações, fígado, olhos e o coração (PEIXOTO, 2014; SOUZA, 2007). Dentre as várias subclassificações da candidíase cutânea, destaca-se a candidíase da unha (paroníquia) e a onicomicose, pois afetam tanto a população imunocompetentes quanto os imunossuprimidos (PEIXOTO, 2014; PEREIRA, 2017).

A paroníquia é uma inflamação da prega ungueal posterior e compromete parte das dobras laterais da unha (BEBER *et al.*, 2012), quando as lesões se cronificam, a matriz ungueal é atingida, a própria unha se altera e o processo passa a ser realmente oníquia ou onicomicose causada por *Cândida* (OLIVEIRA, 2014).

3.2 Onicomicose

O termo onicomicose é derivado da palavra grega *Onyx* que significa unha e *Mykes* que significa fungo, “fungo da unha” (SEN *et al.*, 2018). As onicomicoses são causadas por fungos dermatófitos, fungos filamentosos não dermatófitos e leveduras (SEN *et al.*, 2018; SCHERER, 2017), tendo como principais agentes etiológicos os fungos dermatófitos pertencentes aos gêneros: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* (LAMB *et al.*, 2013). Destas, as espécies mais comuns que afetam as unhas são *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes* e *T. interdigitale*, seguido por fungos filamentosos não dermatófitos, como *Fusarium sp.*, o *Acremonium sp.*, o *Aspergillus sp.* e o gênero *Candida spp.* Vale a pena ressaltar que o gênero *Candida* representa 7% das infecções ungueais causadas por leveduras, com maior prevalência nas unhas das mãos (ARAÚJO *et al.*, 2003; CANESCHI, 2018).

Onicomicoses são consideradas infecções fúngicas crônicas da unha, que podem interferir na qualidade de vida do paciente levando ao comprometimento estético, bem como à baixa autoestima e capacidade funcional, comprometendo inclusive o desempenho no trabalho. A infecção ungueal inicia-se pela borda livre,

podendo atingir superfícies e áreas subungueais. Caracteriza-se pela descoloração, espessamento e deformação das unhas, tornando-as branco amareladas, quebradiças, com poros e superfícies opacas (AZAMBUJA *et al.*, 2014; SCHERER, 2017; SEN *et al.*, 2018; ARAÚJO *et al.*, 2003). Essas infecções ungueais acometem a lâmina ungueal e os tecidos circundantes, representando entre 18 a 50% de todas as onicopatias (SEN *et al.*, 2018; KIKI-BARRO *et al.*, 2017), sendo considerado um problema de saúde pública devido a sua alta prevalência e dificuldade terapêutica associada a altas taxas de recidiva e progressão para lesões crônicas (HEIDRICH *et al.*, 2015; AZAMBUJA *et al.*, 2014).

Segundo Araújo e colaboradores (2003), de acordo com as recomendações da nomenclatura das infecções fúngicas proposta pela "Sociedade Internacional de Micologia Humana e Animal", o termo onicomicose deve ser substituído por *tinea unguium* quando o agente for dermatófito; oníquia por levedura ou candidose ungueal (paroníquia) se forem leveduras do gênero *Candida* as responsáveis pelas lesões e micoses ungueais quando o agente causal for fungo filamentosos oportunista ou não-dermatófito.

As classificações das onicomicoses são feitas de acordo com os tipos de alterações ungueais (ZANARDI *et al.*, 2008; CANESCHI, 2018).

1- Onicomicose subungueal distal e lateral: a invasão começa no Hiponíquio (camada fina da epiderme que faz a ligação entre o leito ungueal e a polpa dital da unha), e na borda dital e lateral da lâmina ungueal, estendendo-se de forma lenta e progressiva até a borda proximal da unha; representa 90% das infecções causadas por *T.rubrum* e *T.mentagrophytes*.

2- Onicomicose branca superficial: geralmente encontrada nas unhas dos pés, representa 2 a 5% das onicomicoses dermatofíticas (causada por fungos que utilizam a queratina como fonte de nitrogênio), como *T.mentagrophytes*. Caracteriza-se pela penetração *in situ* de estruturas fúngicas em direção ao interior da lâmina ungueal, podendo ser favorecida por traumas anteriores.

3- Onicomicose subungueal próximal: o fungo invade primeiramente o estrato córneo da dobra ungueal proximal e subsequentemente, a lâmina ungueal. É observada em indivíduos com AIDS (síndrome da

imunodeficiência adquirida), sendo considerada a variante clínica de menor prevalência, é ocasionada por *T.rubrum* e *T.mentagrophytes*.

4- Onicodistrofia total: é o estágio final das onicomicoses causadas por dermatófitos, fungos filamentosos não dermatófitos e leveduras. Verifica-se acometimento da matriz ungueal, e a totalidade da unha está alterada.

5- Onicomicosose paroníquia, é ocasionada pela *C. albicans* que proporciona a inflamação das bordas laterais e próximas podendo estar associada a infecções por bactérias como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*.

As onicomicoses afetam grande parte da população mundial, por isso vários fatores contribuem para a ocorrência dessa patologia como, idade, sexo, ocupação, imunidade do paciente, tipo de calçado utilizado, banho em piscina comum, higiene das unhas, condição climática, frequência de viagem, Diabetes Mellitus, história familiar, doença vascular periférica, e doenças da pele, tais como hiperidrose, psoríase, onicogribose e trauma ungueal (LAMB *et al.*, 2013; SEN *et al.*, 2018; KIKI-BARRO *et al.*, 2017).

A escolha do tratamento adequado é determinada pelo local e pela extensão da infecção, pela espécie envolvida, bem como pela eficácia, perfil de segurança e cinética dos medicamentos disponíveis (MAGAGNIN *et al.*, 2011). A terapia inclui remoção química ou cirúrgica da unha infectada, terapia de pulso e terapias tópicas, muitas vezes ineficazes; A penetração transungueal do ingrediente ativo é difícil porque os fungos permanecem dentro ou abaixo da placa das unhas (LAMB *et al.*, 2013; TOSTI, 2000); Na terapia sistêmica o tratamento estende-se por longos períodos, acompanhado por uma série de efeitos colaterais, contra indicações e interação com outros fármacos. A terapia combinatória é mais efetiva, quando comparada à monoterapia oral por possibilitar um efeito sinérgico (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA, 2005).

Uma alternativa para tratar as infecções fúngicas superficiais, é a terapia tópica com ciclopirox olamina em combinação com outros antifúngicos, como amorolfina, ácido salicílico e cetoconazol. Em âmbitos de cura, a terapia das infecções ungueais obtiveram respostas consideráveis nas últimas décadas, após a introdução dos antifúngicos orais terbinafina e ITZ, sendo fármacos de escolha para dermatofitoses que não respondem às terapias de uso tópica. (MAGAGNIN *et al.*,

2011; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA, 2005). Ainda conforme Magagnin e colaboradores (2011) o espectro de atividade desses antifúngicos é variável devido à baixa adesão dos pacientes, podendo ter efeitos secundários tais como lesões hepáticas, falta de penetração do fármaco, baixa biodisponibilidade do medicamento, interações medicamentosas com relevância em idosos, ou resistência medicamentosa. Corroborando com a variação de 20 a 50 % da falta do sucesso terapêutico das onicomicoses.

3.3 Itraconazol

O ITZ é um fármaco de pó branco ou quase branco, com alta lipofilicidade (Log p 5,66), praticamente insolúvel em água (ZHANG *et al.*, 2013 e MOREIRA, 2010), sendo comercializado no Brasil em forma de cápsulas de 100mg (MEINERZ, 2007). Segundo Lucena (2014), o ITZ é um agente antifúngico bis-triazólico, resultante da substituição do anel imidazólico por triazólico. Sua função é a inibição da enzima citocromo P-450 através da ligação ao sítio de ação do substrato da enzima, não permitindo que o lanosterol (componente do citocromo P-450) se transforme em ergosterol pela enzima α -14 demetilase. A ausência de ergosterol na membrana de fungos e leveduras, provoca alterações na fluidez da membrana, na conformação espacial de outras enzimas associadas à membrana e resulta também em acúmulo de fosfolípidios e ácidos graxos insaturados no interior das células fúngicas (CARVALHO, 2015). A atividade antifúngica é primeiramente fungioestática, podendo ser fungicida em doses elevadas frente a determinadas espécies fúngicas (ZHANG *et al.*, 2013; MOREIRA, 2010; MEINERZ, 2007).

O ITZ foi desenvolvido no final dos anos 80, sendo o primeiro fármaco de amplo espectro com atividades contra alguns fungos dermatófitos, fungos dimórficos e filamentosos, incluindo fungos causadores de infecções fúngicas invasivas, como *Cryptococcus*, *Aspergillus*, e *Blastomyces* (MOREIRA, 2010; ELMESHAD *et al.*, 2016), respondendo também sobre algumas espécies de *Candida*, como *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida krusei*, na terapia à candidíase mucocutânea, onicomicose e em alguns casos na candidíase vaginal e oral (LUCENA, 2014; COLOMBO, 2013), demonstrando maior afinidade pelo sistema enzimático fúngico (MEINERZ, 2007). Em contra partida, um estudo realizado por Martins e

colaboradores (2017) avaliando o perfil de susceptibilidade do fluconazol (FLU), ITZ, cetoconazol e miconazol em uma micoteca como embasamento para estratégias de combate à candidemias, verificou que das 114 cepas testadas 47% eram resistente ao itraconazol, tendo como predominância nos isolados resistentes *C.tropicalis*, *C.glabrata* e *C.albicans*. Segundo Moreira, (2010), a *Candida glabrata* apresenta resistência cruzada ao ITZ, FLU e cetoconazol, devido à redução da permeabilidade aos derivados azólicos, a um aumento da α -14 demetilase e da esqualeno epoxidase. Estes estudos corroboram com Sanglard e colaboradores (2016) enfatizando que embora os antifúngicos azólicos continuem a predominar como fármacos de escolha para o tratamento das mais diversas infecções causadas por *Candida*, é fundamental o conhecimento e acompanhamento do perfil de resistência de cepas desse gênero.

3.4 Óleos essenciais

Os óleos essenciais constituem os elementos voláteis contidos em muitos órgãos vegetais e estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, exercendo papel fundamental na defesa contra micro-organismos (LIMA *et al.*, 2006). Bhavanani e Ballow (1992) constataram que cerca de 35% dos óleos essenciais possuem propriedades antibacterianas e 60% enfatizam propriedades antifúngicas. Segundo Valeriano e colaboradores (2012) os óleos essenciais originam-se do metabolismo secundário das plantas, sendo constituídos por uma mistura de compostos, principalmente monoterpenos, sesquiterpenos, e derivados oxigenados (álcoois, aldeídos, ésteres, éteres, cetonas, fenóis e óxidos).

A maior ou menor atividade biológica dos óleos essenciais tem se mostrado dependente da composição de seus constituintes químicos como citral, pineno, cineol, cariofileno, elemeno, furanodieno, imoneno, eugenol, eucaliptol, carvacrol e outros. Estes constituintes são responsáveis pelas propriedades antissépticas, antibacterianas, antifúngicas e antiparasíticas (LIMA *et al.*, 2006)

3.4.1 Óleo de melaleuca

A *Melaleuca alternifolia* comumente conhecida como a “árvore do chá”, (em inglês “Tea Tree”) é uma pequena árvore de até 5 metros de altura que possui casca fina e folhas afiladas de aproximadamente 20mm de comprimento, florescendo no verão (CASTRO, 2003). É nativa da costa da Austrália (região de *New South Wales*) e cresce em regiões pantanosas ou próximas a rios (SAGAVE *et al.*, 2015; FLORES *et al.*, 2011; CASTRO, 2003). Ainda segundo CASTRO (2003), *M. alternifolia* pertence à família *Myrtaceae* e o gênero *Melaleuca* reúne aproximadamente 150 espécies, dentre as quais, muitas possuem alto valor comercial devido a produção de óleos essenciais utilizados na medicina popular. As folhas e/ou caule são usados na forma de chá, para tratamento de abrasões cutâneas, picadas de insetos, “dor de dente” e infecções superficiais. *M. alternifolia* possui comprovada ação antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória e antiviral (SAGAVE *et al.* 2015; CASARIN *et al.*, 2017), sendo utilizada em muitas formulações tópicas de grande importância medicinal (CASTRO, 2003).

O óleo essencial de *M. alternifolia* denominado “tea tree oil” (TTO) é obtido por hidrodestilação das folhas (SAGAVE *et al.*, 2015; FLORES *et al.*, 2011) e tem em sua composição hidrocarbonetos terpênicos, geralmente mono e sesquiterpenos, e seus álcoois relacionados, além de mais de 100 constituintes (MARKOVIĆ *et al.*, 2012; FLORES *et al.*, 2011). A composição do óleo é regulada pelo padrão (ISO 4730), no que se refere às máximas e mínimas concentrações de cada um dos seus componentes majoritários. Esse óleo essencial tem como principal constituinte o terpinen-4-ol, seguido de gama-terpieno e alfa-terpieno aos quais se atribui o amplo espectro de atividade biológica, bem como, a atividade antimicrobiana (FLORES *et al.*, 2011 CASARIN *et al.*, 2017). De acordo com Carson e colaboradores (2006); Oliveira e colaboradores (2011), a atividade antifúngica do TTO é frente a cepas de *Aspergillus* spp., *Sacharomyces cerevisiae*, além de leveduras, como *Candida albicans* e *Candida glabrata*.

Entre tantas vantagens, cabe ressaltar que o TTO na sua forma pura apresenta relativa fototoxicidade e potencial alergênico no que se refere ao uso tópico, também pode haver oxidação dos constituintes durante o armazenamento (FLORES *et al.*, 2013; CARSON *et al.*, 2006).

3.5 Nanopartículas poliméricas

A nanotecnologia envolve a caracterização, fabricação e/ou manipulação de estruturas, dispositivos ou materiais que tenham pelo menos uma dimensão de cerca de 1-100 nm de comprimento (CODOVILLA *et al.*, 2015), no qual aplicado na área farmacêutica tem a finalidade de carrear e controlar a liberação de fármacos (SAKATA *et al.*, 2007). Existem diferentes tipos de carreadores nanométricos, cuja preparação exige uma formulação adequada e condições de processamento oportunas. Entre eles, as nanopartículas poliméricas (NCs), nanopartículas lipídicas sólidas (NLs), os lipossomas e as nanoemulsões (NEs) (CODOVILLA *et al.*, 2015).

Nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores que podem variar entre 10-1000 nm de diâmetro, dependendo da sua composição e organização estrutural e diferenciam-se em nanocápsulas (NC) e nanoesferas (NE). As NC contêm um núcleo oleoso cercado por uma membrana polimérica, onde o composto bioativo pode estar adsorvido à membrana polimérica e/ou dissolvido no núcleo oleoso, podendo desse modo ser considerado como um sistema de reservatório. As NE, que não apresentam óleo em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido (CODEVILLA *et al.*, 2015; JADER, 2009).

Na literatura já foram descritas NC para encapsulação do TTO, Flores e colaboradores (2015) desenvolveram nanocápsulas poliméricas contendo óleo essencial de melaleuca que proporcionaram proteção contra a volatilização do núcleo oleoso, aumentando assim, a atividade contra fungos filamentosos (*Trichophyton rubrum*) e leveduras (*C. albicans*). Lucena (2014), desenvolveu NC e nanoemulsões carregadas com ITZ pela técnica de precipitação, onde obteve resultados satisfatórios, visto que verificou alta eficiência de encapsulação para o fármaco, obtendo diâmetro médio de partícula acerca de 180nm para as nanocápsulas poliméricas e 120nm para nanoemulsões. Recentemente nosso Grupo de Pesquisa desenvolveu nanocápsulas poliméricas contendo TTO associado ao metronidazol, onde obteve resultados satisfatórios se tratando de sistemas coloidais (trabalho não publicado). No entanto, até o momento não foi descrito na literatura a proposta de co-encapsulação de TTO e ITZ destinado ao uso tópico, mais precisamente à penetração ungueal.

4 MÉTODOS

4.1 Teste de inchamento / dissolução de filmes poliméricos

Para obtenção dos filmes poliméricos, aproximadamente 150mg dos polímeros Poli (ϵ -caprolactona) (PCL) e de Eudragit RS 100® (EUD), foram pesados em 2mL de acetona. Após a evaporação do solvente, os filmes foram dispersos no óleo a ser empregado no preparo das formulações (TTO). Os filmes foram retirados do contato com o óleo, secos com papel toalha e pesados em balança analítica em intervalos de 0, 7, 15, 30, e 120 dias de imersão, a fim de verificar alterações na massa do polímero decorrentes de sua interação com o óleo (PAESE, 2008).

4.2 Preparo das Nanopartículas Poliméricas

As suspensões de NC foram preparadas pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado descrito por Fessi e colaboradores (1989), utilizando o polímero biodegradável poli (ϵ -caprolactona) (PCL) (JAGER *et al.*,2009). A fase orgânica composta por PCL (60.000 g/mol), TTO (16mg/mL), tensoativo de baixo EHL Span®60, ITZ (0,5mg/mL) e acetona foi aquecida em banho-maria (40 °C) até a completa dissolução dos constituintes. Após preparada, a fase oleosa foi vertida lentamente e sob agitação moderada através de um funil estreito sob a fase aquosa composta de uma solução de tensoativo de alto EHL (Tween 80®) em água ultrapura (MilliQ®). Após a formação das NC, a solução foi mantida sob agitação moderada durante 10 minutos. Em seguida, a suspensão foi concentrada em evaporador rotatório para eliminação do solvente orgânico e parte da água. Como controle, foram preparadas, de modo semelhante, nanopartículas contendo ITZ mas sem o núcleo oleoso de TTO, denominadas nanoesferas (NE) e NC contendo o núcleo oleoso de TTO, mas sem o fármaco. Nanoesferas sem o fármaco (branca) também foram utilizadas como controle. As formulações foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar, protegidos da luz, em temperatura ambiente. Os componentes utilizados em cada formulação para obtenção de 10 mL de suspensão são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1- Composição quali-quantitativa das nanopartículas poliméricas contendo itraconazol associados ou não com óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*

COMPONENTES	QUANTIDADE			
	NE-BR	NE-ITZ	NC-TTO	NC-TTO ITZ
Fase Orgânica				
PCL	0,100g	0,100g	0,100g	0,100g
Span 60®	0,077g	0,077g	0,077g	0,077g
ITZ	X	0,005g	X	0,005g
TTO	X	X	0,16g	0,16g
Acetona	27mL	27mL	27mL	27mL
Fase Aquosa				
Tween 80®	0,077g	0,077g	0,077g	0,077g
Água MilliQ®	53mL		53mL	53mL

Legenda. Composição das nanopartículas poliméricas, desenvolvidas pelo Método de Deposição Interfacial do Polímero Pré-Formado. NE-BR =nanoesfera branca; NE-ITZ =nanoesfera contendo itraconazol; NC-TTO =nanocápsula polimérica contendo TTO; NC-TTO ITZ = nanocápsula polimérica contendo itraconazol associado ao TTO; PCL= polímero Poli (ϵ -caprolactona).

4.3 Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo itraconazol

4.3.1 Determinação do diâmetro da partícula e polidispersão

O tamanho de partícula foi avaliado pela técnica de difratometria de laser utilizando o equipamento Mastersizer® 2000 (Malvern Instruments). Os dados de difração de laser obtidos foram avaliados utilizando o valor D [4,3] que representa o diâmetro médio baseado no volume da partícula, e ainda os valores de 10% (d10%), 50% (d50%) e 90% (d90%) da distribuição, que indicam a percentagem de partículas possuindo diâmetro igual ou inferior ao valor determinado. O valor do Span (Equação 1), que é um indicativo da polidispersão do sistema, também foi utilizado para a caracterização das formulações.

$$SPAN=(d_{0.9}-d_{0.1}) / d_{0.5} \quad \text{Eq. (1)}$$

4.3.2 Determinação de pH

A determinação de pH foi realizada com potenciômetro (Hanna®) calibrado com soluções tampões de pH 4,0 e pH 7,0 diretamente nas formulações de nanopartículas.

4.3.3 Avaliação da atividade *in vitro* utilizando isolados de *Candida spp.*

O perfil de susceptibilidade foi realizado com três isolados do gênero *Candida spp.*, frente ao TTO livre, ao ITZ livre e às nanopartículas desenvolvidas neste trabalho, seguindo o protocolo M27-A3 (Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica), do *Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI* (CLSI 2008). Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços, estéreis, com fundo em U, utilizando o meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640, tamponado com ácido 3-N-morfolino propanosulfônico (MOPS).

O TTO foi solubilizado em Tween 80® e o ITZ em dimetilsulfóxido (DMSO). A solução de trabalho de 1600µg/mL de ITZ foi diluída no meio de cultura RPMI-MOPS e realizadas diluições seriadas até atingir a faixa de concentração final de 0,03µg/mL a 16µg/mL. O mesmo procedimento foi realizado para TTO até atingir a faixa de concentração final de 0,58µg/mL a 300µg/mL. A NE-BR, NE-ITZ e NC-TTO foram testadas utilizando o mesmo procedimento e as mesmas concentrações de trabalho do fármaco livre e do óleo livre. Para a NC em associação (NC-TTO ITZ) a concentração de trabalho foi de 1600µg/mL para TTO, sendo realizadas diluições seriadas até atingir a faixa de concentração final de 0,1µg/mL a 51,2µg/mL e para ITZ a concentração de trabalho foi de 500µg/mL e diluições seriadas foram realizadas até atingir a faixa de concentração final de 0,03µg/mL a 16µg/mL.

C. albicans ATCC 28367, *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. tropicalis* ATCC 750 foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrose a 35°C por 24 horas. Após esse período, as colônias foram suspensas em aproximadamente 5mL de solução salina estéril a 0,85%. A mistura resultante foi padronizada em espectrofotômetro para 0,5 na escala McFarland e diluída no meio de cultura na proporção de 1:100 (v/v),

seguida de uma diluição 1:20 (v/v), correspondendo a um inóculo final de 1×10^3 a 5×10^3 UFC/mL. A determinação da susceptibilidade das cepas de *Candida* também foram realizadas frente ao fluconazol (FLZ) a uma concentração final de 0,125 µg/mL a 64 µg/mL. Para descartar a possibilidade de resultados falsos positivos devido ao Tween 80[®], antes de iniciar os ensaios de suscetibilidade de todos os antifúngicos, o Tween 80[®] foi diluído em RPMI e testado frente a todos os isolados incluídos neste trabalho e comparados com o controle positivo para demonstrar que estas concentrações de diluente não são capazes de inibir as células das leveduras.

As formulações testadas e suas combinações foram: 1. TTO-LIVRE, 2. Itraconazol livre (ITZ-LIVRE), 3. Nanoesfera branca (NE-BR), 4. Nanoesfera de itraconazol (NE-ITZ), 5. Nanocápsula de TTO (NC-TTO), 6. Nanocápsula de TTO e itraconazol (NC-TTO ITZ), 7. Fluconazol livre (FLZ-LIVRE) e 8. Tween 80[®]. Todos os testes foram realizados em triplicata. As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas e a leitura realizada visualmente em comparação com o controle de crescimento do fungo. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi considerada a menor concentração de antifúngico capaz de inibir 100% do crescimento fúngico. Para o ITZ as CIM menores ou iguais a 0,125 µg/mL podem ser classificadas como sensível, e CIM ≥ 1 µg/mL como resistente, já para o fluconazol as CIM menores ou iguais a 8 µg/mL são classificadas como sensível e CIM maiores ou iguais a 64 µg/mL classificam-se como resistente. As CIM obtidas foram feitas em triplicata (ISHAM & GHANNOUM, 2010; CLSI, 2008).

4.3.4 Método *Checkerboard*

Para avaliar o Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) do ITZ com TTO frente aos isolados de *C. albicans* ATCC 28367 e *C. parapsilosis* ATCC 22019 foi realizada a técnica de *Checkerboard* ou tabuleiro de xadrez, conforme Johnson e colaboradores (2004). Os isolados foram cultivados em ágar Sabouraud dextrose durante 24 horas a 35°C. Passados as 24 horas, as colônias foram suspensas em aproximadamente 5 mL de solução salina estéril a 0,85%, mexendo delicadamente. A mistura resultante foi padronizada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 530 nm e diluída no meio de cultura RPMI na proporção de 1:100 (v/v) e depois 1:20 (v/v), correspondendo a $1-5 \times 10^3$ UFC/mL, para ser utilizada no ensaio.

A técnica foi realizada combinando oito diferentes concentrações de TTO e ITZ de 0,12 a 40µg/mL nas placas de 96 poços. As placas foram embaladas com papel filme e incubadas por 24 horas à 35°C e após esse período foi realizada a leitura visual do crescimento das leveduras.

O ICIF foi determinado pela seguinte formula:

$$(CIM\ TTO\ associação/CIM\ TTO) + (CIM\ ITZ\ associação/CIM\ ITZ)$$

Onde:

- CIM TTO associação: Concentração Inibitória Mínima do óleo de Melaleuca alternifolia em associação com itraconazol.
- CIM ITZ associação: Concentração Inibitória Mínima do itraconazol em associação com óleo de Melaleuca alternifolia.

CIM TTO: Concentração Inibitória Mínima do óleo de Melaleuca alternifolia

-CIM ITZ: Concentração Inibitória Mínima do itraconazol

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

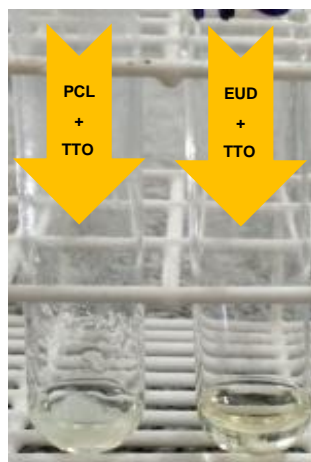
5.1 Teste de inchamento/ dissolução dos filmes poliméricos

Para o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas, é essencial que o polímero empregado na constituição da parede da estrutura vesicular seja insolúvel tanto na água, quanto no óleo formador do núcleo da nanocápsula ou nanoesfera. No entanto é de fundamental importância assegurar que o óleo em que o polímero estará em contato não provocará alterações neste, como inchamento e dissolução (STANGARLIN *et a*, 2014). Filmes de PCL e EUD foram colocados separadamente imersos ao TTO (Figura 1) empregado no preparo das formulações, com intuito de verificar uma possível interação deste com material utilizado para formação da parede polimérica das nanopartículas. A massa inicial de EUD antes do contato com óleo foi de 107 mg. No início do experimento o filme de EUD imerso no TTO foi de 123 mg, sete dias após a imersão o filme de EUD foi solubilizado totalmente no

respectivo óleo. A massa inicial do filme de PCL antes do contato com o óleo foi de 101 mg e após a imersão ao TTO foi de 130 mg. Passados 120 dias de imersão o filme de PCL sofreu uma pequena variação, apresentando uma massa de 162 mg (Figura 2). A pequena variação deve-se, provavelmente, a excesso de óleo aderido no filme de polímero no momento da pesagem. Observa-se que não houve redução na massa do filme, não indicando solubilização do polímero pelo óleo testado. Isto indica a adequabilidade da utilização do óleo essencial de melaleuca no desenvolvimento de nanopartículas de PCL. Nosso estudo corrobora com Bairros (2010) o qual desenvolvendo suspensões de nanocápsulas de adapaleno com diferentes núcleos oleosos, testando a possibilidade de interação do óleo de melaleuca e de Myglyol® com PCL através da avaliação do polímero imerso nos óleos por 42 dias. O autor verificou que a massa do filme de PCL em contato com o óleo de melaleuca variou nos primeiros 6 dias de estudo, ocorrendo um aumento de peso, havendo posteriormente uma constante massa do filme de PCL, indicando que o óleo de melaleuca utilizado nas nanocápsulas não dissolve o polímero, possibilitando dizer que há formação de uma parede polimérica em torno do núcleo oleoso das nanocápsulas.

A Figura 1 demonstra a inteira solubilidade do EUD quando imersos ao TTO e a constante massa do filme de PCL exposto ao respectivo óleo.

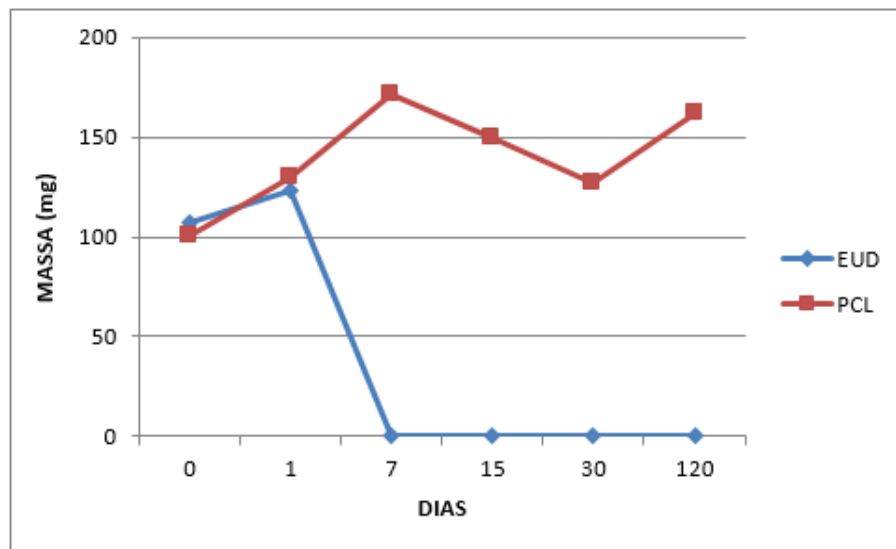
Figura 1- Filmes de Poli (ϵ -caprolactona) e Eudragit RS 100® imersos em TTO, mostrando a inteira solubilidade de Eudragit RS 100® e a adequabilidade do polímero Poli (ϵ -caprolactona) em TTO



Fonte. Elaborado pelo autor

Figura 2 apresenta a interação dos polímeros EUD e PCL imersos ao óleo essencial de TTO, na qual o EUD no sétimo dia em contato com o óleo foi solublizado e em contra partida o PCL obteve uma massa constante em um período de 120 dias.

Figura 2- Massa dos filmes de Poli (ϵ -caprolactona) e Eudragit RS 100® em interação com TTO



Legenda. Teste de inchamento do polímero em avaliação nos dias 0,1,7,15,30,120.

5.2 Preparo das Nanopartículas Poliméricas

Após a preparação, as formulações de nanopartículas apresentaram aparência macroscópica homogênea, coloração branca leitosa, sem odor, com reflexo azulado (efeito *Tyndall*) (Figura 3). O reflexo azulado se deve ao movimento Browniano das partículas, devido ao seu tamanho nanométrico (SCHAFFAZICK *et al.*, 2006).

A Figura 3 apresenta as características macroscópicas das nanopartículas poliméricas preparadas e utilizadas nesse trabalho.

Figura 3- Suspensões de nanopartículas poliméricas apresentaram-se branca, leitosa e opalescente



Legenda: nanoesfera branca (1), nanoesfera de itraconazol (2), nanocápsula de TTO(3), nanocápsula de itraconazol com TTO (4).

5.3 Caracterização físico-química das suspensões de nanopartículas poliméricas contendo itraconazol com ou sem associação

5.3.1 Determinação do diâmetro da partícula e polidispersão

O tamanho de partícula foi determinado usando a técnica de difratometria a laser, usando o equipamento Mastersizer® 2000 (Malvern Instruments), sendo este método adequado para verificar se a formulação contém micropartículas além de nanopartículas (VIEIRA *et al*, 2016). Os valores do diâmetro médio (D [4,3]), diâmetro de 50% das partículas em suspensão (d(0,5)) e a polidispersão (SPAN) determinados para todas as formulações (tabela 2 e figura 4), mostraram-se monomodais e em escala nanométrica para o método de deposição interfacial do polímero pré-formado.

Os valores de SPAN indicaram que os sistemas coloidais obtiveram um tamanho estreito (CONTRI *et al*, 2011), havendo uma variação de valores de 1,420 a 2,058 para a polidispersão dos sistemas coloidais.

A Tabela 2 apresenta os resultados da distribuição de tamanho, a polidispersão e o pH das nanopartículas poliméricas preparadas e utilizadas neste trabalho

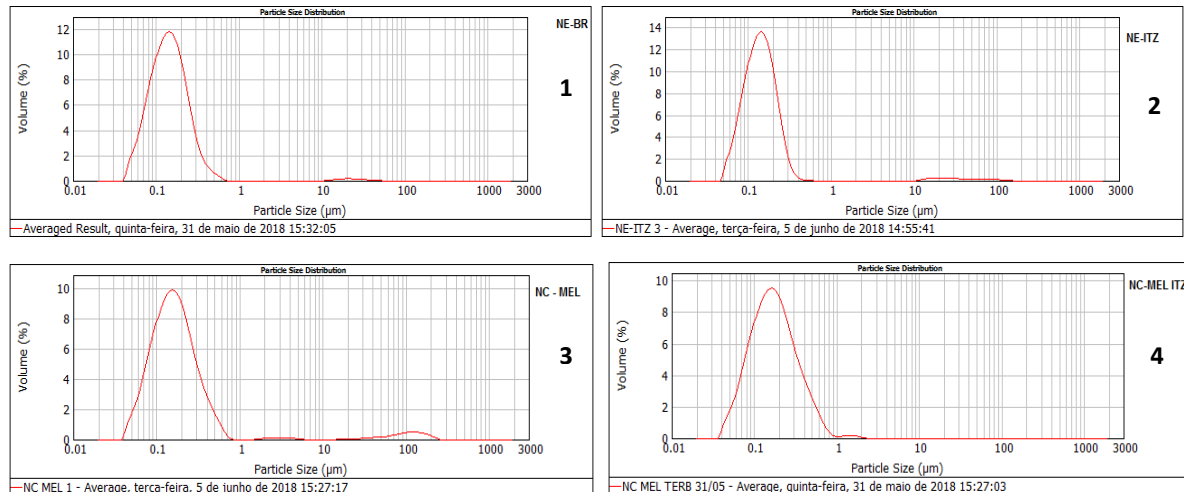
Tabela 2- Caracterização do Tamanho de Partícula, polidispersão e o pH das nanoesferas e nanocápsulas

Amostra	D[4,3]nm	d (0,1)nm	d (0,5)nm	d (0,9)nm	SPAN	pH
NE-BR	387	71	140	270	1,42	6,06
NE-ITZ	123	80	140	244	1,17	5,57
NC-TTO	460	77	161	409	2,05	5,70
NC-TTO ITZ	212	76	166	390	1,93	5,90

Legenda. Determinação do tamanho das partículas e a polidispersão obtidas por Difratometria de Laser e pH analisado por Potenciômetro Digital. **NE-BR** =nanoesfera branca; **NE-ITZ**=nanoesfera com itraconazol; **NC-TTO**=nanocápsulas poliméricas contendo itraconazol; **NC-TTO ITz**=nanocápsulas poliméricas contendo itraconazol associado ao TTO.

A Figura 4 apresenta os resultados da distribuição de tamanho das nanopartículas preparadas

Figura 4- Perfis de distribuição do tamanho por volume determinados pelas nanopartículas poliméricas



Legenda. nanoesfera branca(1), nanoesfera itraconazol (2), nanocápsula TTO (3), nanocápsula TTO associado ao itraconazol (4), obtidos por Difratometria a Laser

5.3.2 Determinação do pH

A determinação do pH é dependente dos componentes da formulação e do fármaco presente. A avaliação do pH é de extrema importância, pois pode evitar a degradação do polímero e do fármaco, contribuindo para uma melhor estabilidade das nanopartículas em relação ao tempo (SCHAFFAZICK *et al*, 2003).

O resultado da determinação do pH é apresentado na Tabela 2, onde os pHs das nanopartículas poliméricas variaram entre 5,57 a 6,06. Este resultado pressupõe uma melhor absorção na pele, já que o pH da pele é levemente ácido entre (4,6 a 5,8) (LEONARDI *et al*, 2002), bem como compatibilidade com o pH das unhas que variam entre 4,4 a 4,5 (GALEMBECK e CSORDAS, 2010).

5.3.3 Avaliação da atividade *in vitro* utilizando isolados de *Candida* spp.

No presente trabalho, a atividade antifúngica do TTO frente *Candida albicans* ATCC 28367 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019 obteve CIM de 37,5µg/MI e para *Candida tropicalis* ATCC 750 a CIM resultante foi de 18,75µg/mL. A susceptibilidade ao itraconazol livre frente aos mesmos isolados citados foi de >16µg/mL indicando resistência ao itraconazol (Tabela 3). O fármaco de primeira escolha recomendado para o tratamento da candidíase causada por *Candida* é o fluconazol. A susceptibilidade ao fluconazol frente aos isolados testados neste estudo foi de CIM 1µg/mL para *C. albicans* ATCC 28367 e *C. parapsilosis* ATCC 22019 e CIM 4µg/mL para *C. tropicalis* ATCC 750, indicando sensibilidade dos isolados testados ao fluconazol, conforme preconizado pelo CLSI 2008.

Após a avaliação do método de *Checkerboard*, a associação de TTO com ITZ para inibição de *C. albicans* ATCC 28367 e *C. parapsilosis* ATCC 22019 obteve uma ação de indiferença na combinação das frações ($0,5 < ICIF < 4$). Este resultado se deve pelo fato que o ITZ é resistente aos isolados testados, e com isso o efeito obtido na inibição é do TTO e não há interação entre os mesmos (Tabela 4). Posteriormente foi avaliada a NC – TTO ITZ com a finalidade de melhorar o efeito da associação entre os dois antifúngicos testados, porém o teste de atividade *in vitro* contra *C. albicans* ATCC 28367, *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. tropicalis* ATCC 750 obtiveram CIM > 51,2Mg/mL. O mesmo resultado ocorreu para a susceptibilidade das NE – ITZ, NC - TTO frente a estes isolados. A suspensão controle (NE-BR), não apresentou atividade inibitória frente aos mesmos isolados, mostrando que não há influência do PCL e dos tensoativos sobre técnica de microdiluição *in vitro* usando isolados de *Candida*.

Considerando a atividade do TTO, o nosso estudo corrobora com Rasteiro e colaboradores (2014) que em vários estudos *in vitro* determinaram a Concentração Inibitória Mínima de TTO necessária para erradicar biofilmes de *C. albicans* ATCC 18804 e os efeitos dessa concentração no tratamento da candidíase oral induzida em um modelo de camundongo imonossuprimido, utilizando 24 camundongos. Neste estudo os autores obtiveram uma CIM de 1,95mg/mL do óleo essencial de melaleuca frente a *C. albicans* ATCC 18804, sendo capaz de atingir o resultado proposto pelo autor. Ainda, estudo realizado por Mondello e colaboradores (2006)

avaliou a atividade do terpinen-4-ol (principal componente do óleo essencial do TTO) contra espécies de *Candida* patogênicas resistentes ao fluconazol e itraconazol como *Candida albicans* ATCC 24433, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 *in vivo*, usando um modelo de candidíase vaginal induzida por estrogênio em ratos, onde se verificou que o componente majoritário do TTO inibiu todos os isolados testados, obtendo CIM entre 0,015% a 0,06% para este terpinen-4-ol. Já Kengne e colaboradores (2017), em estudos com itraconazol, fluconazol, miconazol, cetoconazol e nistatina, para determinar os padrões de susceptibilidade antifúngica *in vitro* de espécies de *Candida* isoladas do trato genital de 245 de mulheres no Hospital Yaoundé Bethesda, em Camarões, verificaram que apenas 16,2% dos isolados de *Candida* coletados (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida dublinienses*) eram sensíveis à ação do itraconazol, e 31,1% resistentes sob ação deste antifúngico, obtendo o maior índice de resistência em comparação aos outros antifúngicos testados.

Em relação as NC-TTO, Flores (2011) desenvolveu nanoemulsão e nanocápsulas poliméricas contendo TTO pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado, que frente a uma concentração inicial próxima a 3,7 log UFC/mL de *C. albicans*, foram capazes de reduzir essa concentração para aproximadamente 2,2 log UFC/mL em um período de 48 horas de incubação. Após esse período, a concentração de *C. albicans* exposta à nanocápsula contendo TTO manteve-se constante, porém quando exposta a nanoemulsão contendo TTO houve uma variação na concentração da *C. albicans*, aumentando para $2,8 \pm 0,1$ log UFC/mL e em 72 horas de incubação para $3,1 \pm 0,2$ log CFU/mL. Quando testadas a nanoemulsão e nanocápsula polimérica contendo TTO em uma concentração de 5 log UFC/mL de *C. albicans*, a nanoemulsão contendo TTO não foi capaz de reduzir o crescimento do isolado, por outro lado a nanocápsula polimérica contendo TTO reduziu o crescimento de *C. albicans* em 4,5 log UFC/mL em um período de 24 horas, não ocorrendo variações de concentrações em função do tempo, como visto em nanoemulsão contendo TTO. O efeito inibitório desses sistemas coloidais contendo TTO frente aos isolados de *C. albicans* se dá pela metodologia realizada para o desenvolvimento desses sistemas, na qual as suspensões coloidais tem um período de evaporação menor, obtendo um volume final de 50mL da suspensão, sugerindo ser um volume adequado para não haver perda de TTO na formulação e

consequentemente obter resultados inibitórios frente a *C. albicans*. Flores (2011), sugere ainda, que as diferenças apresentadas nas formulações desenvolvidas em relação à sua composição e tipo de estrutura, também favoreceram para um efeito inibitório das nanocápsulas poliméricas contendo TTO melhor do que das nanoemulsões, considerando que as nanoemulsões são dispersões finas de óleo em água que não possuem uma camada protetora ao redor do óleo, enquanto as nanocápsulas poliméricas são compostas por um núcleo oleoso envolvido por uma parede polimérica, favorecendo uma maior proteção do óleo contra a evaporação.

A tabela representa a Concentração Inibitória Mínima dos isolados de *Candida* frente ao TTO

Tabela 3- Concentração Inibitória Mínima de TTO, itraconazol e fluconazol frente a *Candida tropicalis* ATCC 750, *Candida albicans* 28367 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019

ISOLADOS		CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA ($\mu\text{g}/\text{ML}$)		
		TTO	ITZ	FLZ
<i>C.tropicalis</i> 750	ATCC	18,75	>16	4
<i>C. albicans</i> ATCC 28367		37,5	>16	1
<i>C.parapsilosis</i> 22019	ATCC	37,5	>16	1

Legenda. Técnica de microdiluição utilizando o meio de cultura RPMI. TTO = óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*; ITZ=itraconazol; FLZ= fluconazol

A tabela 4 mostra a relação entre as Concentrações Inibitória mínima do TTO e ITZ com o Índice da Concentração Inibitória Mínima Fracionada frente aos isolados de *C.albicans* ATCC 28367 e *C. parapsilosis* e 22019

Tabela 4- Índice da Concentração Inibitória Mínima Fracionada do TTO e itraconazol frente a *Candida albicans* ATCC 28367 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019, obtendo como resultado indiferença.

Leveduras isoladas	Frações Isoladas µg/MI		Frações Combinadas µg/mL		
	TTO	ITZ	TTO	ITZ	ICIF
<i>C.albicans</i> ATCC 28367	20	>16	10	>16	1,5
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	10	>16	10	2	1,6

Legenda. Técnica avaliada por microdiluição, utilizando meio de cultura RPMI, cuja fórmula matemática utilizada é $(CIM\ TTO\ associação / CIM\ TTO) + (CIM\ ITZ\ associação / CIM\ ITZ)$. TTO= óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*; ITZ itraconazol; ICIF= Índice da Concentração Inibitória Mínima Fracionada

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

O desenvolvimento das nanopartículas poliméricas contendo ITZ e TTO utilizando poli- ϵ caprolactona (PCL) pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado apresentou tamanho da partícula e polidispersão de acordo com o escrito na literatura, indicando ser sistemas coloidais monomodais.

O teste de atividade antifúngica utilizando óleo essencial de *M. alternifolia* apresentou inibição significativa dos isolados avaliados, propondo ser um potencial antifúngico contra isolados de *Candida* spp. Em contra partida o ITZ não inibiu os isolados de *C.albicans* ATCC 28367, *C. parapsilois* ATCC 22019 e *C.tropicalis* ATCC 750 indicando resistência destes isolados para este fármaco. As suspensões de nanoesfera e nanocápsulas poliméricas desenvolvidas não obtiveram êxito quanto a inibição dos isolados no teste de microdiluição em placas. Para uma melhor análise sobre o uso concomitante do óleo essencial *M. alternifolia* com itraconazol, o método de *Checkerboard* foi avaliado, demonstrando indiferença.

Diante dos resultados apresentados neste trabalho e os encontrados na literatura as perspectivas para continuidade dos estudos são:

Testar isolados de *Candida* e dermatófitos resistentes ao fluconazol e outros antifúngicos;

Testar a associação de outros antifúngicos com TTO e com outros fármacos antifúngicos com intuito favorecer um efeito sinérgico;

Alterar a metodologia de preparo das formulações empregando menor tempo ou força de vácuo para evaporação, visando evitar perda de TTO que é volátil.

7. REFERÊNCIAS

- ALTHAUS, V. A., REGGINATO, A., BOSSETTI, V., & SCHMIDT, J. C. Espécies se *Candida* Spp. em Isolados Clínicos e Suscetibilidade a Antifúngicos de uso Hospitalar. ***Saúde e Pesquisa***, 8(1), 7-17, 2015.
- ARAÚJO AJG, SOUZA MAJ, BASTOS OM, Oliveira JC. Occurrence of onychomycosis in patients treated at dermatology clinics in the city of Rio de Janeiro, Brazil. ***An Bras Dermatol*** 78: 299-308, 2003.
- ARAÚJO, T. D., & SCHACHNER, L. Benign vesicopustular eruptions in the neonate. ***Anais brasileiros de dermatologia***, 81(4), 359-366, 2006.
- AZAMBUJA, C. V. D. A., PIMMEL, L. A., KLAFKE, G. B., & XAVIER, M. O. Onychomycosis: clinical, mycological and in vitro susceptibility testing of isolates of *Trichophyton rubrum*. ***Anais brasileiros de dermatologia***, 89(4), 581-586, 2014
- BARRIOS, J. G. Desenvolvimento e caracterização de suspensões contendo nanocápsulas de adapaleno com diferentes núcleos oleosos. **Diss. Dissertação de Mestrado**, Centro Universitário Franciscano, Brasil, 2010.
- BANDEIRA, Y. R..S.V; SABADIN, C. E. S. Presença de candidíase e fungos do gênero *Candida* em pacientes submetidos à quimioterapia. ***Journal of Oral Investigations***, v. 5, n. 2, p. 33-39, 2017.
- BEBER, M. C., CAUDURO, P., SONDA, E. C., & DE AVELAR BREUNIG, J. Alteração crônica periungueal. ***Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção***, 2(2), 70-72, 2012.
- BENEDETTI, V. P., SAVI, D. C., ALUIZIO, R., ADAMOSKI, D., KAVA-CORDEIRO, V., GALLI-TERASAWA, L. V., & GLIENKE, C. Analysis of the genetic diversity of *Candida* isolates obtained from diabetic patients and kidney transplant recipients. ***Memórias do Instituto Oswaldo Cruz***, 111(7), 417-422, 2016.
- CANESCHI, C. A. Ação antifúngica de derivados amino álcoois e diaminas frente aos principais causadores de onicomicoses. Tese (Doutorado) **Programa de Pós-graduação em Saúde Brasileira**, Faculdade de Medicina. Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), 2018.
- CARVALHO, M. G. Avaliação biofarmacêutica visando subsidiar associação dos fármacos benzimidazol e itraconazol. 127 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – **Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto**, 2015.
- 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.

CASARIN, M., PAZINATTO, J., SANTOS, R. C. V., & ZANATTA, F. B. Melaleuca alternifolia and its application against dental plaque and periodontal diseases: A systematic review. *Phytotherapy Research*, 32(2), 230-242, 2018.

CASTRO, M. C. A. Ocorrência de espécies do complexo Candida parapsilosis em amostras biológicas de pacientes e profissionais de hospitais do Natal/RN. 77f. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) - **Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte**, Natal, 2017.

CATHCART, S.; CANTRELL, W.; ELEWSKI, B. E. Onychomycosis and diabetes. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, v. 23, n. 10, p. 1119-1122, 2009.

CINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTO (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast. 3rd ed. **Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute**. (Document M27-A3), 2008.

CODEVILLA, C. F., BAZANA, M. T., DA SILVA, C. D. B., BARIN, J. S., & DE MENEZES, C. R. Nanoestruturas contendo compostos bioativos extraídos de plantas. *Ciência e Natura*, 37(5), 142-151, 2015.

COLOMBO, A. L., GUIMARÃES, T., CAMARGO, L. F. A., RICHTMANN, R., DE QUEIROZ-TELLES, F., SALLES, M. J. C., ... & NUCCI, M. Brazilian guidelines for the management of candidiasis—a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 17(3), 283-312, 2013.

CONTRI .R. V, KAISER. M, POLETTO. F.S., POHJMANN. A.R., GUTERRES. S.S. Simultaneous control of capsaicinoids release from polymeric nanocapsules, *Journal of nanoscience and nanotechnology*. V.11, n.3, p. 2398–2406, 2011.

CORRÊA, R. D. O. Avaliação in vitro da atividade antifúngica de extratos vegetais frente aos principais microrganismos causadores da candidíase. Dissertação (mestrado acadêmico) - **Universidade Federal de Juíz de Fora**. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira, 2017.

CROCCO, E. I., MIMICA, L. M., MURAMATU, L. H., GARCIA, C., SOUZA, V. M., RUIZ, L. R., & ZAITZ, C. Identification of Candida species and antifungal susceptibility in vitro: a study on 100 patients with superficial candidiasis. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 79(6), 689-697, 2004.

DE CAMPOS RASTEIRO, V. M., DA COSTA, A. C. B. P., ARAÚJO, C. F., DE BARROS, P. P., ROSSONI, R. D., ANBINDER, A. L., ... & 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*, 14(1), 489, 2014.

- DE ASSIS, D. N., A, R. S., FUSCALDI, L. L., FERNANDES, S. O. A., MOSQUEIRA, V. C. F., & CARDOSO, V. N. Biodistribution of free and encapsulated 99m Tc-fluconazole in an infection model induced by *Candida albicans*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 99, p. 438-444, 2018.
- DOS SANTOS PEDROSO, R., DE PAULA MENEZES, R., FERREIRA, J. C., PENATTI, M. P. A., de Sá, W. M., MALVINO, L. D. S., ... & de AQUINO MOREIRA, T. Sensibilidade de isolados de *candida spp.* a antifúngicos por disco-difusão em ágar e microdiluição em caldo. **Bioscience Journal**, 30(1), 2014.
- ELMESHAD, A. N.; MOHSEN, A. M. Enhanced corneal permeation and antimycotic activity of itraconazole against *Candida albicans* via a novel nanosystem vesicle. **Drug delivery**, v. 23, n. 7, p. 2115-2123, 2016.
- FESSI, H. P. F. D; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J.P.; AMMOURY, N., & B, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International journal of pharmaceuticals**, v. 55, n. 1, p. R1-R4, 1989.
- FLORES, F. C. SISTEMAS NANOESTRUTURADOS CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia*: DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES E ATIVIDADE BIOLÓGICA. Dissertação (Mestrado). **Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**. Universidade Federal de Santa Maria Centro de Ciências da Saúde, 2011.
- FLORES, F. C., DE LIMA, J. A., RIBEIRO, R. F., ALVES, S. H., ROLIM, C. M. B., BECK, R. C. R., & DA SILVA, C. B. Antifungal activity of nanocapsule suspensions containing tea tree oil on the growth of *Trichophyton rubrum*. **Mycopathologia**, 175(3-4), 281-286, 2013.
- GALEMBECK, F., CSORDAS, Y. Cosméticos: a química da beleza. 2010. Disponível em: <http://web.ccead.pucrio.br/condigital/mvsl/Sala%20de%20Leitura/conteudos/SL_cosmeticos.pdf> Visualizado em 13/06/18
- HEIDRICH, D., GARCIA, M. R., STOPIGLIA, C. D. O., MAGAGNIN, C. M., DABOIT, T. C., VETORATTO, G., & SCROFERNEKER, M. L. Dermatophytosis: a 16-year retrospective study in a metropolitan area in southern Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries**, 9(08), 865-871, 2015
- ISHAM, N. & GHANNOUM, M.A. Antifungal activity of miconazole against recent *Candida* strains. **Mycoses**, v. 53, n. 5, p. 434-7, 2010.
- JÄGER, E.; VENTURINI, C. G.; POLETTO, F. S.; *et al.* Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, p. 130–140, 2009.
- JOHNSON, M. D. et al. Combination antifungal therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 693-715, 2004.

- KIKI-BARRO, P. C. M., KONATÉ, A., KASSI, F. K., ANGORA, E. K., BOSSON-VANGA, H., BEDIA-TANO, A. V., ... & MENAN, E. I. H. Mycological profile of hand onychomycosis amongs " Garba" sellers in Abidjan (Côte d'Ivoire). **Journal de mycologie medicale**, 2017.
- KLIEMANN, D. A., PASQUALOTTO, A. C., FALAVIGNA, M., GIARETTA, T., & SEVERO, L. C. Candida esophagitis: species distribution and risk factors for infection. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, 50(5), 261-263, 2008.
- KUVANDIK, G., ÇETIN, M., GENCTOY, G., HOROZ, M., DURU, M., AKCALI, C., & KAYA, H. The prevalence, epidemiology and risk factors for onychomycosis in hemodialysis patients. **BMC infectious diseases**, 7(1), 102, 2007.
- LAMB, F. M., STOPIGLIA, C. D. O., VETORATTO, G., GOLDANI, J. C., & SCROFERNEKER, M. L. Frequency of onychomycoses in chronic renal failure patients undergoing hemodialysis in Porto Alegre, Brazil. **Acta Dermatovenerol Croat**, 21, 19-23, 2013.
- LEAL, M. R. D., LIMA, M. C. N. P. C., KLEIN, S. D. O. T., & GARBOGGI, P. V. S. L. TRATAMENTO DA CANDIDÍASE VULVOVAGINAL E NOVAS PERSPECTIVAS TERAPÊUTICAS: UMA REVISÃO NARRATIVA. **Revista Pesquisa em Fisioterapia**, 6(4), 2016.
- LEONARDI, G. R.; GASPAR, L.R; CAMPOS, P.MBG. Study of pH variation on the skin using cosmetic formulations with and without vitamins A, E or ceramide: by a non-invasive method. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 77, n. 5, p. 563-569, 2002.
- LIMA, I. D. O., OLIVEIRA, R. D. A. G., LIMA, E. D. O., FARIAS, N. M. P., & SOUZA, E. L. D. Antifungal activity from essential oils on Candida species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 16(2), 197-201, 2006.
- LIMA, K. M. L., DELGADO, M. D., DE MELO REGO, R. S., & DE CASTRO, C. M. M. B. Candida albicans e Candida tropicalis isoladas de onicomicose em paciente HIV-positivo: co-resistência in vitro aos azólicos. **Revista de Patologia Tropical**, 37(1), 57-64, 2008.
- LUCENA, P. A.. Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas poliméricas contendo itraconazol. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - **Universidade Federal de Goiás, Goiânia**, 2014.
- LIU, Y.; ZHANG, B.; YAN, B. Enabling Anticancer Therapeutics by Nanoparticle Carriers: The Delivery of Paclitaxel. **International Journal of Molecular Science**. 12, p. 4395-4413, 2011.

KENGNE, M., SHU, S. V., NWOBEGAHAY, J. M., & ACHONDUH, O. Antifungals susceptibility pattern of *Candida* spp. isolated from female genital tract at the Yaoundé Bethesda Hospital in Cameroon. ***Pan African Medical Journal***, 28(1), 2017.

MACHADO G, PIPPI B, DALLA L. D, et al. Reversal of fluconazole resistance induced by a synergistic effect with *Acacia senegal* in *Candida glabrata* strains. ***Pharmaceutical Biology***, v. 6, p. 1-10, 2016.

MARKOVIĆ, T., MARKOVIĆ, D., PERIĆ, T., GLAMOČLIJA, J., Stojković, D., & SOKOVIĆ, M. Screening of antimicrobial and antioxidant activity of commercial *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oils. ***Journal of Medicinal Plants Research***, 6(22), 3852-3858, 2012.

MARTINS, A., FUENTEFRIA, A., ANDRADE, S., SILVEIRA, G., KULKAMP, I., PIPPI, B., & FRIZZO, C. Caracterização do perfil de susceptibilidade a antifúngicos azólicos de uma micoteca como embasamento para estratégias de combate à candidemias. ***Journal of Infection Control***, 5(4), 2017.

MEINERZ, A. R. M. Avaliação da atividade in vivo e in vitro da terbinafina e itraconazol frente ao *Sporothrix schenckii*. Tese (doutorado) - **Universidade Federal de do Rio Grande do Sul**. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinária, 2007.

MIRANTE, D. C. Desenvolvimento Tecnológico e Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Micropartículas de Polilisina e de Nanocápsulas contendo óleo essencial de *Melaleuca Alternifolia* Cheel (Myrtaceae). f.89. ***Dissertação (Mestrado em Farmacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia)*** - UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA, Ponta Grossa, 2015.

MOREIRA, MIMCG. Azóis: farmacologia e interações medicamentosas. Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para a obtenção do grau de licenciatura em Ciências Farmacêuticas. **Universidade Fernando Pessoa. Porto**, 2010.

NG, S. M. S., YAP, J. M., LAU, Q. Y., NG, F. M., ONG, E. H. Q., BARKHAM, T., ... & Arumugam, P. Structure-activity relationship studies of ultra-short peptides with potent activities against fluconazole-resistant *Candida albicans*. ***European journal of medicinal chemistry***, 150, 479-490, 2018.

NIKOLIĆ, M. M., JOVANOVIĆ, K. K., MARKOVIĆ, T. L., MARKOVIĆ, D. L., GLIGORIJEVIĆ, N. N., RADULOVIĆ, S. S., ... & 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***, 69(11), 1606-1614, 2017.

NORBERG, A. N., de SANTA HELENA, A. A., MADEIRA-OLIVEIRA, J. T., SANCHES, F. G., RIBEIRO, P. C., MACHADO, A. N., & FREIRE, N. M. S. Prevalência de Candidíase vulvovaginal em mulheres da região da Baixada Fluminense, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Pensar Acadêmico**, 12(1), 109-114, 2017.

OLIVEIRA, J. C. de. Tópicos em Micologia Médica / Jeferson Carvalhaes de Oliveira – Rio de Janeiro; 230 págs.; il. Col., 2014. Disponível em:< https://controllab.com/pdf/topicos_micologia_4ed.pdfAcesso em: 13 abr.2018 >

OLIVEIRA, A. C. M., FONTANA, A., NEGRINI, T. C., NOGUEIRA, M. N. M., BEDRAN, T. B. L., ANDRADE, C. R., ... & SPOLIDÓRIO, D. M. P. Emprego do óleo de *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) na odontologia: perspectivas quanto à utilização como antimicrobiano alternativo às doenças infecciosas de origem bucal. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, 492-499, 2011.

PAESE, K. Desenvolvimento tecnológico, estudo da fotoestabilidade e avaliação da permeação cutânea in vitro da benzofenona-3 a partir de nanocápsulas poliméricas incorporadas em diferentes veículos semissólidos. **Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 2008.

PARAMYTHIOTOU, E., FRANTZESKAKI, F., FLEVARI, A., ARMAGANIDIS, A., & DIMOPOULOS, G. Invasive fungal infections in the ICU: how to approach, how to treat. **Molecules**, 19(1), 1085-1119, 2014.

PEIXOTO, J.. CANDIDÍASE-UMA REVISÃO DE LITERATURA. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**. Vol.8,n.2,pp.75-82. 2014.

PEREIRA, J. A. Atividade antifúngica do geraniol sobre leveduras multirresistentes do gênero candida e perfil farmacológico e toxicológico em estudos in silico. **Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação. Universidade Federal do Paraíba**, 2017.

POOWANAWITTAYAKOM, N., DUTTA, A., STOCK, S., TOUray, S., ELLISON III, R. T., & LEVITZ, S. M. Reemergence of Intravenous Drug Use as Risk Factor for Candidemia, Massachusetts, USA. **Emerging infectious diseases**, 24(4), 631, 2018.

RANAWAKA, R. R., & SILVA, S. H. Factors influencing cure rates of non-dermatophyte mold and Candida onychomycosis: analysis of outcomes in 81 patients who completed treatment. **International journal of dermatology**, 56(2), 202-208, 2017.

SCHAFFAZICK, S. R., GUTERRES, S. S., FREITAS, L. L. D. L., & POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química nova**. São Paulo. Vol. 26, n. 5 (2003), p. 726-737, 2003.

SCHAFFAZICK, S. R., POHLMANN, A. R., MEZZALIRA, G., GUTERRES, S. S. Development of nanocapsule suspensions and nanocapsule spray-dried powders containing melatonin. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 3, p. 562-569, 2006.

SEN, A., BHUNIA, D., DATTA, P. K., RAY, A., & BANERJEE, P. A study of onychomycosis at a tertiary care hospital in Eastern Bihar. **Indian Journal of Dermatology**, 63(2), 141, 2018.

SIMÕES, R. J., FONSECA, P., & FIGUEIRAL, M. H. Infecções por candida spp na cavidade oral. **Odontologia Clínico-Científica (Online)**, 12(1), 19-22, 2013.

SOUSA, E. C.. Avaliação da atividade in vitro de nanoemulsões e nanocápsulas de fluconazol contra cândida spp. Dissertação do (Mestrado) – Universidade Federal de Ouro Preto. **Instituto de Ciências Exatas e Biológicas**. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, 2007.

SAGAVE, L., GRESSLER, L. T., FLORES, F. C., SILVA, C. B., VARGAS, A. P. C., LOVATO, M., ... & BOTTON, S. A. *Melaleuca alternifolia* activity in nanoformulations and terpinen-4-ol against *Rhodococcus equi* isolates. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 67(1), 221-226, 2015.

SAKATA, S., UCHIDA, K., KAETSU, I., & KITA, Y. Programming control of intelligent drug releases in response to single and binary environmental stimulation signals using sensor and electroresponsive hydrogel. **Radiation Physics and Chemistry**, 76(4), 733-737, 2007.

SANGLARD, D.. Emerging threats in antifungal-resistant fungal pathogens. **Frontiers in medicine**, v. 3, p. 11, 2016.

SCHERER, K. D. G. Atividade antifúngica do óleo essencial *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia) em agentes causadores de onicomicoses. **Projeto de pesquisa apresentado à disciplina de Trabalho de Curso II**, do Curso de Farmácia da Universidade de Santa Cruz do Sul, 2017.

SHARIFZADEH, A., KHOSRAVI, A. R., SHOKRI, H., & SHIRZADI, H. Potential effect of 2-isopropyl-5-methylphenol (thymol) alone and in combination with fluconazole against clinical isolates of *Candida albicans*, *C. glabrata* and *C. krusei*. **Journal de mycologie medicale**, 2018.

STANGARLIN, MFL. Avaliação da influência do óleo e do polímero sobre as características físico-químicas e estabilidade de sistemas nanoestruturados contendo ubiquinona. 2014. **Dissertação (Mestrado)**. **Universidade Federal de Santa Maria**, Santa Maria, 2014.

SWAMIAPPAN, M., CHANDRAN, V., RAMASAMY, S., SRIDHAR, V., & VANATHI, T. Candidal balanoposthitis--a retrospective study in a tertiary care centre of South India. **Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences**, 5(95), 7042-7046, 2016.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA. Manual de Conduta nas Onicomicoses: **Diagnóstico e Tratamento**. p. 191-202, 2005.

YAPAR, N.. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. ***Therapeutics and clinical risk management***, v. 10, p. 95, 2014.

YANG, S., LIAO, Y., CONG, L., Lu, X., YANG,R. *In Vitro* interactions between non-steroidal anti-inflammatory drugs and antifungal agents against planktonic and biofilm forms of *Trichosporon asahii*. **PLoS ONE**, v.11, n.6, 2016.

TOSTI, A.; PIRACCINI, BM.; LORENZI S. Onychomycosis caused by nondermatophytic molds: Clinical features and response to treatment of 59 cases. ***J Am Acad Dermatol***. 42:217-24, 2000.

UIP, D. E.; TMV, S. Candidíase esofagiana. ***Rev Bras Med Trop***, v. 57, p. 1294, 2000.

VALERIANO, C., PICCOLI, R. H., CARDOSO, M. G., & ALVES, E. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar. ***Revista Brasileira de Plantas Medicinai***s, 14(1), 57-67., 2012.

VAGHASIYA, H., KUMAR, A., & SAWANT, K. Development of solid lipid nanoparticles based controlled release system for topical delivery of terbinafine hydrochloride. ***European Journal of Pharmaceutical Sciences***, 49(2), 311-322, 2013.

VASCONCELOS, C. N. E. et al. Estudo comparativo entre terapia oral e local no tratamento de corrimentos vaginais: candidíase, tricomoníase e vaginose bacteriana. ***Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research***, v. 15, p. 123-128, 2016.

VIEIRA, S. M., MICHELS, L. R., ROVERSi, K., METZ, V. G., MORAES, B. K., PIEGAS, E. M., ... & COLOMÉ, L. M. A surface modification of clozapine-loaded nanocapsules improves their efficacy: a study of formulation development and biological assessment. ***Colloids and Surfaces B: Biointerfaces***, 145, 748-756, 2016.

ZANARDI, D., NUNES, D. H., PACHECO, A. D. S., TUBONE, M. Q., & SOUZA FILHO, J. J. D. Evaluation of the diagnostic methods of onychomycosis. ***Anais Brasileiros de Dermatologia***, 83(2), 119-124, 2008.

ZHANG, K., Yu, H., LUO, Q., YANG, S., LIN, X., ZHANG, Y.& TANG, X. Increased dissolution and oral absorption of itraconazole/Soluplus extrudate compared with itraconazole nanosuspension. ***European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics***, 85(3), 1285-1292, 2013.

