



Universidade Federal de Goiás

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

Isaque de Sousa Aquino

Obtenção e investigação da atividade de nanoemulsão de óleo de melaleuca em *Candida albicans*

**Goiânia
2023**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a tulo de divulgação da produção científica brasileira, a par r desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

ISAQUE DE SOUSA AQUINO

3. Título do trabalho

Obtenção e investigação da atividade de nanoemulsão de óleo de melaleuca em *Candida albicans*.

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido

pelo orientador) Concorda com a liberação total do documento

SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a par r da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);
- b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de ar go em revista científica; - Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Andre Correa Amaral, Professor do Magistério Superior**, em 01/03/2024, às 13:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Isaque De Sousa Aquino, Discente**, em 11/03/2024, às 16:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4414586** e o código CRC **198387A6**.

ISAQUE DE SOUSA AQUINO

Obtenção e investigação da atividade de nanoemulsão de óleo de melaleuca em *Candida albicans*

Dissertação de Mestrado na área de concentração em Genética e Biologia Molecular apresentada ao Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás, para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. André Corrêa
Amaral

Goiânia

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Aquino, Isaque de Sousa

Obtenção e investigação da atividade de nanoemulsão de óleo de melaleuca em *Candida albicans* [manuscrito] / Isaque de Sousa Aquino. - 2023.

64 f.

Orientador: Prof. Dr. André Corrêa Amaral.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, Goiânia, 2023.

Bibliografia.

Inclui siglas, abreviaturas, gráfico, tabelas, algoritmos, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Infecção fúngica;. 2. Nanotecnologia;. 3. Vulvovaginite;. 4. Árvore chá;. 5. Melaleuca alternifolia.. I. Amaral, André Corrêa, orient. II. Título.

CDU 60



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº **116** da sessão de Defesa de Dissertação de **Isaque de Sousa Aquino**, que confere o título de Mestre em **Genética e Biologia Molecular**, na área de concentração em **Genética e Biologia Molecular**.

Aos **quinze dias do mês de dezembro de dois mil e vinte e três**, a partir das **14h**, na sala 207 do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada “**Nanoemulsão de óleo de melaleuca como tratamento alternativo para candidíase vulvovaginal**”. Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, Professor Doutor **André Corrêa Amaral (IPTSP/UFG)** com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professora Doutora **Viviane Lopes Rocha (IPTSP/UFG)**, membro titular externo; Professora Doutora **Maysa Paula da Costa Reis (IPTSP/UFG)**, membro titular externo. Durante a arguição os membros da banca **[fizeram]** sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido o candidato **[aprovado]** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Professor Doutor **André Corrêa Amaral**, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos **quinze dias do mês de dezembro de dois mil e vinte e três**.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

Obtenção e investigação da atividade de nanoemulsão de óleo de melaleuca em *Candida albicans*.



Documento assinado eletronicamente por **Andre Correa Amaral**, Professor do Magistério Superior, em 15/12/2023, às 18:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_or_gao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4224985** e o código CRC **D378EBD8**.

Referência: Processo nº 23070.067629/2023-14

SEI nº 4224985

**Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular
Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno: Isaque de Sousa Aquino

Orientador (a): Prof. Dr. André Corrêa Amaral

Membros:

1. Prof. Dr. André Corrêa Amaral

2. Dra. Viviane Lopes Rocha

3. Profa. Dra. Maysa Paula da Costa Reis

Data: 15/12/2023

Dedico este trabalho a Deus, porque sem Ele eu não estaria aqui e também aos meu país, minha irmã Nattuza, minha família e a minha família da igreja, que nunca me deixaram desistir e me ajudaram a passar por cada momento difícil.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, foram muitos momentos de choro e noites mal dormidas pensando que eu não iria conseguir, mas Ele sempre me tranquilizou nos dias mais difíceis e me deu força para chegar até aqui.

Agradeço ao meu pai, Jussiêr Saraiva de Aquino, minha mãe, Eliane de Sousa Batista Saraiva, minhas irmãs, Nattuza Saraiva de Aquino e Danielle de Sousa Monteiro, por sempre me incentivarem a continuar, pela atenção, pelo cuidado e principalmente pelas orações. Vocês fizeram parte de uma rede de apoio extremamente necessária nesse tempo na minha vida. Agradeço também pelos meus parentes próximos que lutaram essa luta como se fosse deles e se preocuparam comigo desde o início, agradeço pelas orações e palavras de conforto que me acalmaram em meio as preocupações.

Quero agradecer ao meu amigo e pastor Joab Silas da Silva Junior, que sempre me ouviu quando eu precisava conversar e sempre falou quando eu precisava ouvir, foram palavras de consolo que aqueceram meu coração. Agradeço a Gabriela Camargo Terra que sempre me aconselhou a permanecer firme, também a minha família na igreja, que não diferente oraram por mim durante todo esse tempo.

Agradeço ao meu orientador e professor André Corrêa Amaral, que me deu oportunidade de crescer junto ao seu laboratório e por me ajudar a chegar até aqui. Agradeço a todos os amigos do LANAB, em especial a Jacqueline que sempre me ajudou e me ensinou quando eu precisava e também a nossa técnica Viviane que partilhou de seus conhecimentos comigo, sentada ao redor de uma mesa e rabiscando em folhas de A4 tornando o conteúdo o mais fácil possível para que eu pudesse entender, com ela aprendi muita coisa que vou levar para a vida.

Agradeço aos técnicos do IPTSP e UFG por terem contribuído de alguma forma. Agradeço a CAPES pela bolsa concedida. Agradeço a todas as pessoas que tenham contribuído direta ou indiretamente para esse trabalho.

A todos, meus agradecimentos sinceros e que Deus abençoe vocês!

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	13
1.1 <i>Candida spp</i>	13
1.2 Candidíase Vulvovaginal (CVV)	15
1.3 Tratamento para CVV	17
1.4 Plantas medicinais	19
1.5 Óleo essencial.....	19
1.5.1 <i>Melaleuca alternifolia</i> e seu óleo essencial	19
1.6 Nanotecnologia e nanoemulsões	22
1.7 Surfactantes	26
1.8 Sistemas de medidas.....	27
1.8.1 Potencial Zeta	27
1.8.2 Índice de Polidispersão (PDI).....	27
2.JUSTIFICATIVA	29
3.OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo Geral	30
3.2 Objetivos Específicos.....	30
4. MÉTODOS	31
4.1 Padronização de Nanoemulsão de óleo de melaleuca	31
4.1.1 Preparo das nanopartículas vazias	32
4.2 Caracterização da nanoemulsão	33
4.2.1 Tamanho, índice de polidispersão e potencial Zeta	33
4.2.2 Teste de estabilidade	33
4.2.3 Teste de volume	33
4.3 Teste de atividade antifúngica <i>in vitro</i> para a nanoemulsão	33
4.3.1 Micro-organismo e Condições de crescimento	33
4.3.2 Inóculo de <i>Candida albicans</i> para o teste de concentração mínima inibitória (CIM)	34
4.3.3 Teste de Concentração Mínima Inibitória (CIM).....	34
4.4 Ensaio de toxicidade	35
4.4.1 Teste de Hemólise	35
4.5 Análise estatística	35
5. RESULTADOS	36
5.1 Comparação entre os protocolos avaliados.....	36
5.1.1 Padronização da nanoemulsão de óleo de melaleuca.....	36

5.2 Preparo das nanopartículas vazias	39
5.3 Teste de estabilidade	39
5.4 Teste de volume	41
5.5 Teste de Concentração Mínima Inibitória (CIM)	43
5.6 Teste de Hemólise	43
6.DISSCUSSÃO	46
7.CONCLUSÃO.....	49
8.PERSPECTIVAS	50
9.REFERÊNCIAS	51

FIGURAS E TABELAS

Figura 1 - Aspectos morfológicos de *Candida albicans* mostrando Hifa (G), Pseudo Hifa (H) e Levedura (I).

Figura 2 - Ilustração arbusto *Melaleuca alternifolia*.

Figura 3 - Estrutura química Terpinen-4-ol.

Figura 4 - Estrutura química Terpinoleno.

Figura 5 - Estrutura química 1,8-Cineol.

Figura 6 - Óleo em água e água em óleo em emulsões. Nanoemulsões estão desequilibrados sistemas de água em óleo (A/O) ou emulsões de óleo em água (O/A).

Figura 7 - Tipos de separações que podem ocorrer a partir de uma emulsão.

Figura 8 - Nanoemulsão contendo óleo de melaleuca.

Figura 9 - Gráfico indicando a variação populacional em porcentagem dos tamanhos encontrados na leitura de caracterização e padronização da NOM.

Figura 10 – Nanoemulsão contendo Óleo de Melaleuca, em temperatura ambiente longe da exposição a luz solar, Dia 1.

Figura 11 - Nanoemulsão contendo Óleo de Melaleuca, em temperatura ambiente longe da exposição a luz solar, Dia 14.

Figura 12 – Placa de 96 poços do teste de hemólise após centrifugação. Placa 1.

Figura 13 - Placa de 96 poços do teste de hemólise após centrifugação. Placa 2.

Figura 14 - Valores obtidos em porcentagem (%) no ensaio de hemólise.

Tabela 1 - Estabilidade coloidal para faixas de potencial Zeta.

Tabela 2 - Resumo dos parâmetros utilizados para análise de protocolos da nanoemulsão contendo óleo de melaleuca.

Tabela 3 - Valores encontrados na adaptação 1 após caracterização da nanoemulsão.

Tabela 4 - Valores encontrados na adaptação 2 após caracterização da nanoemulsão.

Tabela 5 - Valores encontrados na adaptação 3 após caracterização da nanoemulsão.

Tabela 6 - Valores encontrados na adaptação 4 após caracterização da nanoemulsão.

Tabela 7 – Teste de Estabilidade 30 dias e Média e Desvio Padrão dos resultados finais, dia 1.

Tabela 8 – Teste de Estabilidade 30 dias e Média e Desvio Padrão dos resultados finais, dia 7.

Tabela 9 – Teste de Estabilidade 30 dias e Média e Desvio Padrão dos resultados finais, dia 14.

Tabela 10 – Teste de Estabilidade 30 dias e Média e Desvio Padrão dos resultados finais, dia 21.

Tabela 11 – Teste de Estabilidade 30 dias e Média e Desvio Padrão dos resultados finais, dia 30.

Tabela 12 - Resultados dos cálculos realizados com a fórmula de volume.

SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (Coleção de Cultura do Tipo Americano)
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CVV	CVV
CVVR	CVV Recorrente
NOM	Nanoemulsão de óleo de melaleuca
NV	Nanoemulsão vazia
OL	Óleo livre
PDI	Índice de Polidispersão
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (Instituto Memorial Roswell Park)

RESUMO

A candidíase vulvovaginal (CVV) é associada ao gênero *Candida* com alta frequência entre as mulheres e tem sido alvo de amplas pesquisas científicas que visam aprimorar as alternativas de tratamento dessa patologia, sendo a *Candida albicans* a espécie encontrada na maior parte dos casos, exceto em casos de resistência aos antifúngicos onde podem ser encontradas espécies não-*albicans* que também podem dificultar a ação dos fármacos existentes responsáveis pelo tratamento da CVV. O objetivo do estudo foi realizar o preparo de uma formulação contendo o óleo de melaleuca e demonstrar a eficácia do seu uso em nanoemulsão como tratamento alternativo para a CVV. A nanoemulsão foi preparada por meio da técnica de ultrassonificação demonstrando uma aparência visual homogênea sem sedimentações no preparo final. A caracterização da nanoemulsão foi feita analisando-se o tamanho e Índice de Polidispersão (PDI) pelo processo de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), e para os resultados do Potencial Zeta foi feito o procedimento de Espalhamento de Luz Eletroforético, todos analisados no equipamento Zetasizer, os valores obtidos de média foram: 15,74nm de diâmetro, 0,4 de PDI e -25,29mV de potencial Zeta. O teste de estabilidade da nanoemulsão no período de 30 dias apresentou resultados satisfatórios com boa estabilidade das nanopartículas. As Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) para o óleo de melaleuca apresentaram bons resultados na ação de inibição do crescimento da *C. albicans* ATCC 10231. Os ensaios de toxicidade em hemácias demonstraram hemólise nas concentrações iniciais da nanoemulsão e resultados positivos nas diluições seguintes.

Palavras chaves: Infecção fúngica; Nanotecnologia; Vulvovaginite; Árvore chá; *Melaleuca alternifolia*.

ABSTRACT

Vulvovaginal candidiasis (VVC) is associated with the genus *Candida* with a high frequency among women and has been the target of extensive scientific research aimed at improving treatment alternatives for this pathology, with *Candida albicans* being the species found in most cases, except in cases of resistance to antifungals where non-*albicans* species can be found, which can also hinder the action of existing drugs responsible for treating VVC. The objective of the study was to prepare a formulation containing tea tree oil and demonstrate the effectiveness of its use in nanoemulsion as an alternative treatment for VVC. The nanoemulsion was prepared using the ultrasonification technique, demonstrating a homogeneous visual appearance without sedimentation in the final preparation. The characterization of the nanoemulsion was carried out by analyzing the size and Polydispersity Index (PDI) using the Dynamic Light Scattering (DLS) process, and for the Zeta Potential results, the Electrophoretic Light Scattering procedure was carried out, all analyzed in the equipment Zetasizer, the average values obtained were: 15.74nm in diameter, 0.4 in PDI and -25.29mV in Zeta potential. The nanoemulsion stability test over a period of 30 days showed satisfactory results with good stability of the nanoparticles. The Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) for tea tree oil showed good results in inhibiting the growth of *C. albicans* ATCC 10231. Toxicity tests on red blood cells demonstrated hemolysis in the initial concentrations of the nanoemulsion and positive results in subsequent dilutions.

Keywords: Fungal infection; Nanotechnology; Vulvovaginitis; Tea tree; *Melaleuca alternifolia*.

1.INTRODUÇÃO

1.1 *Candida spp.*

Considera-se que existam aproximadamente seis milhões de espécies de fungos ao redor do mundo, aos quais desses, apenas 600 espécies aproximadamente são capazes de causar doenças nos seres humanos (Naglik; 2014; Taylor, et al; 2014). Apesar da maioria das infecções fúngicas serem superficiais, algumas espécies são capazes de causar infecções mais graves e até mesmo fatais ao hospedeiro infectado (Naglik; 2014).

Infecções fúngicas tem sido uma ameaça na saúde pública mundial, devido seu aumento nas últimas três décadas (Shoham & Levitz; 2005; Naglik, et al; 2011; Naglik; 2014). Sendo as espécies relatadas com maior incidência patogênica: *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* e *Candida albicans* (Köhler, Casadevall & Perfect; 2015).

As espécies associadas ao gênero *Candida* são microorganismos considerados como comensais, podendo se tornar patogênicos, quando expostos a situações onde há baixa imunidade proveniente do hospedeiro, sendo caracterizados como patógenos oportunistas (Monod, Borg-Von & Zepelin; 2002). Os fungos do gênero *Candida*, são constituídos de cerca de 200 espécies que se diferenciam, podendo viver em diversas partes do corpo humano (Kauffman; 2005).

O gênero *Candida* abrange espécies leveduriformes, seu tamanho pode variar entre 2 a 6µm, reproduzem por brotamento, e em sua grande parte formam pseudo-hifas e hifas em seus tecidos, sendo as colônias caracterizadas por possuírem coloração branca a creme e superfície que pode variar entre lisa ou rugosa (Kauffman; 2005; Neto & Danesi; 2005; Alvares & Svidzinski; 2007).

A mesma é caracterizada pela formação de blastósporos, tubos germinativos, pseudo-hifas, verdadeiros micélios e clamidósporos em meios nutrientes especiais (**Figura 1**), geralmente, a formação de pseudo-hifas é um sinal de infecção, exceto para *C. glabrata* e algumas outras espécies de *Candida*, que comumente formam blastósporos (Sobel; 2007).

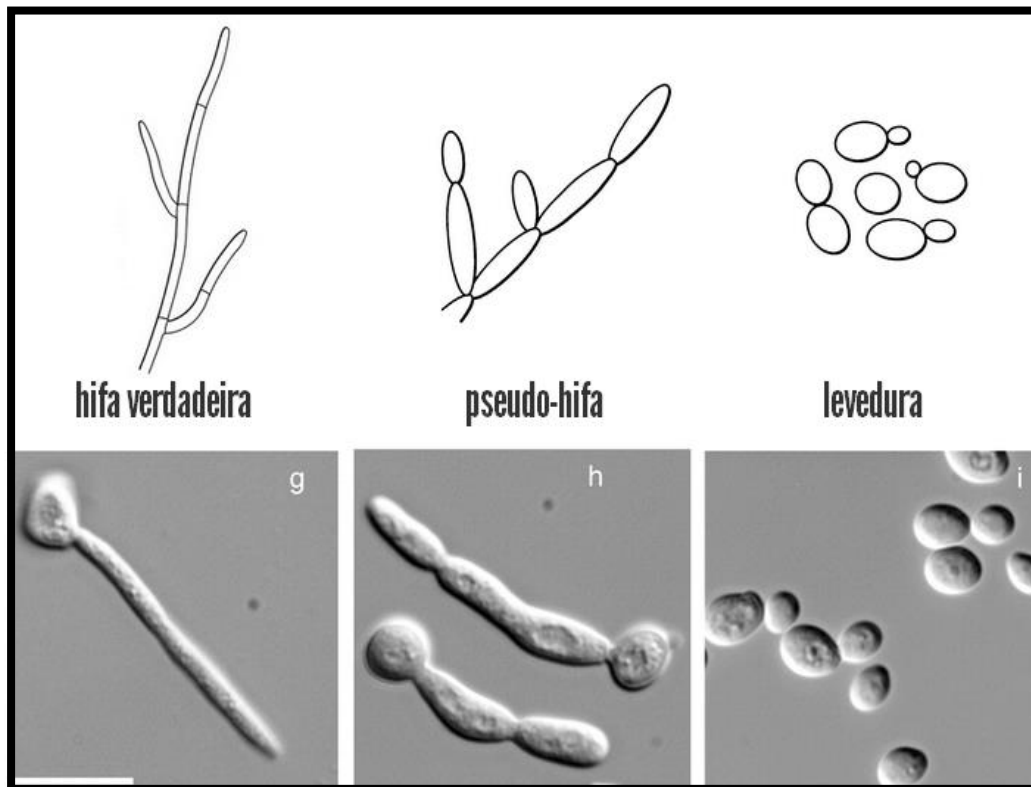


Figura 1: Aspectos morfológicos de *Candida albicans* mostrando Hifa (G), Pseudo Hifa (H) e Levedura (I). **Fonte:** <https://www.biomedicinapadrao.com.br/2016/06/como-diferenciar-uma-hifa-de-uma-pseudo.html>

Os fatores também conhecidos como fatores de virulência que ganham destaque nas espécies do gênero *Candida* abrangem: As secreções de enzimas hidrolíticas, tigmotropismo (ex.: onde uma planta tem contato com algum objeto e cresce ao redor dele, podendo também acontecer com fungos), expressão de adesinas e invasinas, bomba de efluxo, formação de biofilme e também a morfologia celular (Thompson, et al; 2011; Silva, et al; 2012; Mayer, et al; 2013; Polke, et al; 2015).

Para que haja a infecção e colonização desses microorganismos, é necessário que as paredes de resistência mecânica sejam ultrapassadas, também as paredes de bloqueio bioquímico e físico-químico (como pH elevado e produção de muco) nos hospedeiros aos quais se encontram, destacando se também a imunidade inata e adquirida (Polke, et al; 2015; Poulain; 2015).

A infecção por *Candida* usualmente se dá no deslocamento de seu habitat natural direto para a corrente sanguínea ou outros tecidos, sendo a tentativa mais utilizada de defesa do hospedeiro a fagocitose e também a eliminação através dos neutrófilos, monócitos e macrófagos, vários mecanismos operam no interior dos neutrófilos e macrófagos, esses mecanismos podem provocar a eliminação total das leveduras (Kauffman; 2005).

A espécie *C. albicans* está presente na microbiota humana como uma levedura polimórfica diplóide de superfícies mucosas sendo comumente encontrada em humanos no trato gastrointestinal, respiratório e genitálias, geralmente é um fungo comensal inofensivo que pode se transformar em um organismo oportunista (Kashem et al., 2015).

A *Candida albicans* ganha destaque em estudos pois constitui 60% das amostras clínicas isoladas, sendo a levedura presente na microbiota do ser humano (Barbedo & Sgarbi; 2010).

A *C. albicans* obteve a habilidade de colonizar partes diferentes do corpo humano, é por esse motivo que a espécie se destaca por sua maior predominância em infecções do gênero (Calderone & Clancy; 2011). As diferentes partes do corpo humano também conhecidas como sítios humanos demonstram diferentes microbiotas bem como diferentes aspectos físico-químicos que podem aumentar a possibilidade de uma adaptação até mesmo onde as condições não são favoráveis para a colonização (Polke; et al; 2015).

Além da *C. albicans* existem outras espécies que são infecciosas, mas nesse caso é encontrado com menor frequência, são elas: *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* e *C. guilliermondii*, sendo que, a *C. glabrata* e a *C. krusei* demonstram resistência maior ao fluconazol (Antifúngico) (Kauffman; 2005).

Candida albicans e outras espécies incluindo *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* representam um número considerável de infecções fúngicas sistêmicas ao redor do mundo. Esses organismos são encontrados com mais frequência em infecções orais vaginais (ex.: candidíase vulvovaginal) ou mucosas e também podem, em condições propícias, entrar na corrente sanguínea levando a infecções de tecidos profundos (Conti, et al; 2014; Turner & Butler; 2014; Whaley et al; 2017).

1.2 Candidíase vulvovaginal (CVV)

A candidíase vulvovaginal (CVV) é o motivo com mais frequência em consultas ginecológicas (Sobel; 2007; Wei, et al; 2017), sendo encontrada em maior prevalência em pacientes de idade fértil (Barousse, et al; 2004), ocorrendo em aproximadamente 75% das mulheres saudáveis, aos quais destas, 40 a 50% obterão recidivas da doença (Dota, et al; 2011; Sekhvat, et al; 2011).

A microbiota vaginal é colonizada por *Lactobacillus sp* onde encontra-se um pH que varia de 4,0 a 5,0 havendo uma produção de ácido láctico, bacteriocinas e peróxido de hidrogênio aos quais tem como função reduzir o aumento de microorganismos que causarão algum tipo de desordem no ambiente vaginal, porém, quando há um desequilíbrio, o ambiente vaginal se torna favorável para o crescimento excessivo de *Candida*, ocasionando o desenvolvimento da CVV (Johal, et al; 2014, Gonçalves, et al; 2016).

A CVV é uma infecção da vagina e do vestíbulo que podem se espalhar para fora dos pequenos lábios, grandes lábios e intercrurais e regiões perianais, além de sua alta prevalência, a CVV pode causar um alto nível de estresse na paciente afetada (To, et al; 2019). Pesquisas apontam que entre 70-75% das mulheres desenvolverão CVV ao menos uma vez durante sua vida (Cole; 2006).

Apesar da CVV não ser uma doença associada à mortalidade, a mesma possui um grau de morbidade elevado (Gonçalves, et al; 2016), a infecção fúngica pode causar desconforto, dor, problemas emocionais como ansiedade, problemas econômicos (direto ou indiretamente) e também pode atrapalhar nas relações afetivas e sexuais, os sintomas comumente relatados são pruridos, ardência ou dor na região vaginal podendo ser acompanhadas por disúria (dor ao urinar) ou dispareunia (dor durante o ato sexual), sendo outros sinais frequentes relatados a vermelhidão presente na região da vulva e o corrimento vaginal (Poulain; 2015).

Os sintomas são mais frequentemente relatados no meio do ciclo menstrual, devido ao aumento de níveis de estrogênio com alto conteúdo de glicogênio, e durante a fase lútea, enquanto há um breve declínio dos sintomas após a diminuição dos níveis de estrogênio durante a menstruação (Calderone & Clancy; 2011).

Mulheres que usam contraceptivos orais combinados, também apresentam níveis mais altos de estrogênio, assim como mulheres na pós-menopausa em terapia de reposição hormonal, e ambos os grupos têm risco aumentado de desenvolver a CVV (Thompson, et al; 2011). Quando se há a alteração da fase assintomática para sintomática e um excesso na colonização vaginal pode se classificar como motivos primordiais para o seu início (Johal, et al; 2014).

Estudos demonstram que existem vários agentes que podem suscitar o surgimento da CVV tais como: contraceptivos orais, aparelhos intrauterinos, reposição hormonal, uso em excesso de antibióticos, imunossupressão, ducha vaginal frequente, espermicidas, gravidez, ciclo menstrual, diabetes, hábitos sexuais específicos, hábitos de higiene pessoal e a tipos de vestimenta, podem contribuir na modificação da microbiota vaginal (Barousse et al; 2004; Johal, et al; 2014; Gonçalves, et al; 2016).

Segundo relatos sintomáticos das pacientes, a CVV pode ser dividida em duas categorias, são elas: graves e não graves. Sendo que em não graves, existem relatos onde há prevalência de até quatro sintomas no ano em pacientes saudáveis, com isso a seriedade é dada como baixa ou levemente moderada, podendo estar presente também relatos como sintomas de febre sendo a infecção causada por *C.albicans*. Já se tratando de casos graves, a infecção se dá devido a espécies não *albicans*, onde em situações mais complexas podem acontecer com qualquer espécie de *Candida* (Gonçalves, et al; 2016).

Cinco por cento das mulheres com CVV irão desenvolver candidíase vulvovaginal recorrente (Mayer, et al; 2013). Cinquenta por cento dessas mulheres experimentarão recorrência de sintomas de alguns dias a três meses após o tratamento de episódios individuais, técnicas moleculares de análises têm apresentado evidências de que esse fator de suscetibilidade recorrente se dá devido à presença persistente de *Candida* na vagina em vez de uma possível reinfecção (Silva, et al; 2012).

A candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR) é definida com quatro ou mais relatos sintomáticos micologicamente comprovados anualmente, sendo a mesma classificada como uma complicação da CVV (Silva, et al; 2012).

A recidiva vaginal tem sido uma das explicações para a CVVR, relatando que uma pequena quantidade residual de *Candida* se mantém na vagina após tratamento causando a recorrência da candidíase (Vazquez, et al; 1994).

Estudos apontam que a mesma cepa vaginal pode ser encontrada em episódios sequenciais de CVV (Odds, et al; 1989) e que 25 a 50% das mulheres tendem a recidivas, mesmo após testarem cultura negativa, dentro de quatro a seis semanas de tratamento (Sobel; 1997).

1.3 Tratamento para a CVV

As mulheres que apresentam CVV, precisam realizar exames laboratoriais e análises clínicas com o intuito de confirmar a existência do fungo no corpo, identificando qual a espécie presente, e eliminando outras possíveis causas, sendo que, mais ou menos 10% das mulheres podem manifestar infecção mista, ou seja, com diferentes espécies de *Candida* e também por outros patógenos, nesses casos o tratamento precisa ser realizado de modo distinto (Sobel, et al; 2004).

O sucesso do tratamento para a CVV é baseado inicialmente em regime de supressão através da administração de antifúngicos por via oral a longo prazo, sendo indicado com frequência o antifúngico fluconazol ou qualquer azólico tópico em um período que pode variar entre 07 a 14 dias, para que haja a melhora clínica e microbiológica do paciente antes que se inicie um regime de proteção para que não haja recorrências, nesses casos se utilizado o tratamento de início em um curto prazo a probabilidade de uma recidiva é maior em 50% no período de 3 meses (Kauffman, 2005).

Existem controvérsias em relação ao tratamento das mulheres com recorrência (CVVR) logo após o final do tratamento a longo prazo, estudos descrevem mulheres assintomáticas porém que se tornaram dependentes do uso de fluconazol. (Kauffman; 2005). Usar antimicóticos azólicos em excesso pode eliminar as cepas com menor incidência de resistência, contudo as cepas mais resistentes e as não *albicans* permanecem no organismo (Sobel & Chain; 1997).

Dentro dos tratamentos convencionais disponíveis, temos os seguintes antifúngicos e seu poder de ação:

Antifúngicos azóis possuem a ação de inibir a enzima do citocromo P450 14 α -lanosterol desmetilase, esse é o responsável por participar da rota da biossíntese do ergosterol nas leveduras e fungos com filamentos. No gênero *Candida*, a enzima pode ser produzida através do gene *ERG11*, que se encaixa em uma das enzimas que são responsáveis por participar da última parte da rota de produção de lanosterol em ergosterol (Akins; 2005, Prasad, Shah & Rawal; 2016).

O gene *ERG11*, também conhecido como gene lanosterol 14-alfa desmetilase, é um elemento genético essencial encontrado em vários fungos, incluindo espécies patogênicas como *C. albicans*, este gene desempenha um papel central na biossíntese do ergosterol, um componente crítico da membrana celular dos fungos (Sanglard & Odds; 2002).

Quando existem mutações no gene *ERG11* normalmente são associadas a resistência aos azóis, afetando a expressão do gene podendo alterar a compatibilidade do lanosterol-14-a-desmetilase nos fármacos azóis (Carvalho, et al; 2013, Gołabek, et al; 2015), também nas alterações quantitativas destas proteínas (Ren, et al; 2014; Song; 2004).

As alilaminas impedem a biossíntese de ergosterol pela inibição da enzima escaleno epoxidase, essa codificada através do gene *ERG1* (um componente crucial na via biossintética do ergosterol, desempenhando um papel central na síntese do ergosterol), responsável pela conversão do escaleno em lanosterol, impossibilitando a biossíntese de ergosterol da membrana (Akin; 2005). A obstrução do escaleno epoxidase pode acarretar o excesso de escaleno no interior da célula e uma queda no conteúdo do ergosterol, tais processos são os responsáveis pelo impedimento do crescimento do fungo (Rang, et al; 2007).

Existem também os antifúngicos poliênicos que são definidos por interagir com o componente principal da membrana celular dos fungos, o ergosterol, quando essa interação acontece existe a formação de poros transmembrana, nesses casos um canal iônico é criado causando a redução de íons intracelulares (Prasad, Shah & Rawal; 2016; Kristanc, et al; 2019).

E por último, as equinocandinas que tem como ação o impedimento da síntese da parede celular de fungos, esse impedimento se mostra não competitivo na enzima (1,3) - β -D-glucana sintase, que é a precursora na síntese do polímero (1,3) - β -D-glucana, componente primordial da parede celular, que se conecta de forma covalente a outro polímero a (1,6) - β -D-glucana, e em conjunto com a quitina compõem uma rede tridimensional de alta complexidade de microfibrilas (Onishi, et al; 2000, Perlin; 2011). A interrupção da enzima inibe a biossíntese da parede celular, acarretando a lise celular prejudicando a célula (Emri, et al; 2013; Prasad, Shah & Rawal; 2016).

Para tentar se associar à terapia convencional ou até mesmo substituí-la, existem relatos do uso de tratamentos alternativos para CVV tais como: Probióticos (Parma, et al; 2018), Alho (Jain, et al; 2017) e Óleo de Melaleuca (Mondello, et al; 2006).

1.4 Plantas Medicinais

Com o avanço do desenvolvimento da ciência e das tecnologias voltadas para a área da saúde, possibilitou-se uma maior visibilidade para que as plantas medicinais tivessem seu valor terapêutico reconhecido, se tornando objeto de pesquisas em diversas áreas para que se conheça melhor suas propriedades terapêuticas (Lorenzi & Matos; 2002).

Ao redor de todo mundo as plantas medicinais tem sido utilizadas como opção à medicina convencional, ganhando destaque ao cuidado de doenças nos seres humanos, devido as suas propriedades antimicrobianas (Menezes et al., 2016). Grande parte da população mundial (75%) possui a necessidade do uso de plantas na sua rotina com medicamentos para tratamento (Richwagen et al., 2019).

As plantas medicinais podem também fornecer uma ampla quantidade de metabólitos secundários, grande parte contendo ação antifúngica. Alguns compostos abarcam flavonoides, fenóis entre outros de extrema importância (Bennet & Wallsgrove; 1994; Gomez-Garibay, et al; 1990)

Iniciando no ano em 2007, o sistema público de saúde brasileiro começou a distribuir fitoterápicos derivados de plantas medicinais, o Ministério da Saúde (MS) oferece medicamentos fitoterápicos na rede pública de saúde, advindos de plantas que estão adicionadas na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS) (Brasil; 2012).

1.5 Óleos essenciais

Além do seu poder fitoterápico as plantas tem ganhado avanço no estudo da eficácia dos óleos essenciais que são comumente obtidos através da extração nas cascas, flores, folhas, caules e frutos utilizando uma técnica conhecida como arraste a vapor, possuindo ampla utilização na perfumaria, na área dos cosméticos e na área alimentícia, alguns óleos essenciais também são usados de forma secundária em medicamentos (Novacosk & Torres; 2006).

1.5.1 *Melaleuca alternifolia* e seu óleo essencial

A espécie *Melaleuca alternifolia*, é proveniente da família *Myrtaceae* sendo nativa da Austrália, é comumente conhecida como "Árvore Chá" ou "Casca de Papel" (**Figura 2**), o óleo extraído dessa espécie é chamado de óleo da "Árvore do chá" ou *Tea Tree Oil* (TTO), sendo caracterizado como um líquido de cor amarelo, com cheiro marcante e levemente refrescante (Homer, et al;

2000). O óleo essencial pode ser classificado em três quimiotipos principais: Terpinen-4-ol, Terpinoleno e 1,8-cineol (Padovan, et al; 2017).



Figura 2: Ilustração arbusto *Melaleuca alternifolia*. **Fonte:** <https://villa.pomarsanto.com.br/oleo-essencial-de-melaleuca-organico>

O Terpinen-4-ol (**Figura 3**) é um álcool monoterpeneo de ocorrência natural com propriedades antimicrobianas. É eficaz contra *Staphylococcus aureus* e resistente à meticilina (Loughlin; 2008). Também pode inibir mediadores pró-inflamatórios (Hart, et al; 2000). e atuar como um potencial agente anticancerígeno (Shapira, et al; 2016).

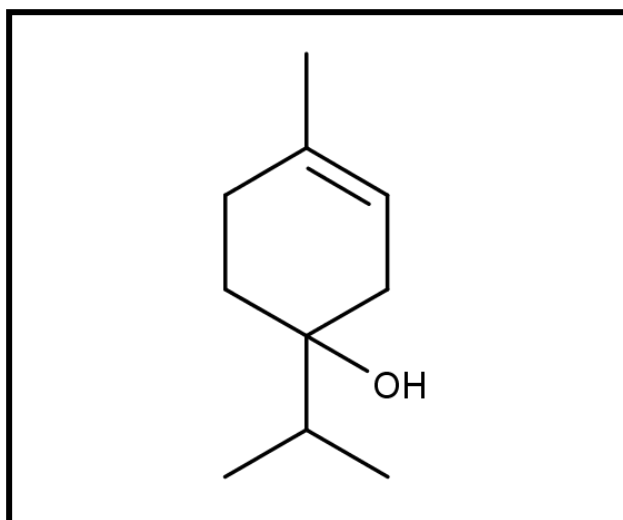


Figura 3: Estrutura química Terpinen-4-ol. **Fonte:** Cymitquimica

O Terpinoleno (δ -terpineno) (**Figura 4**), encontrado naturalmente em ervas, que é frequentemente usado como agente aromatizante, possui alta capacidade antioxidante e potenciais propriedades antiproliferativas (Li & Liu; 2009; Aydin, Türkez & Ta Sdemir; 2013).

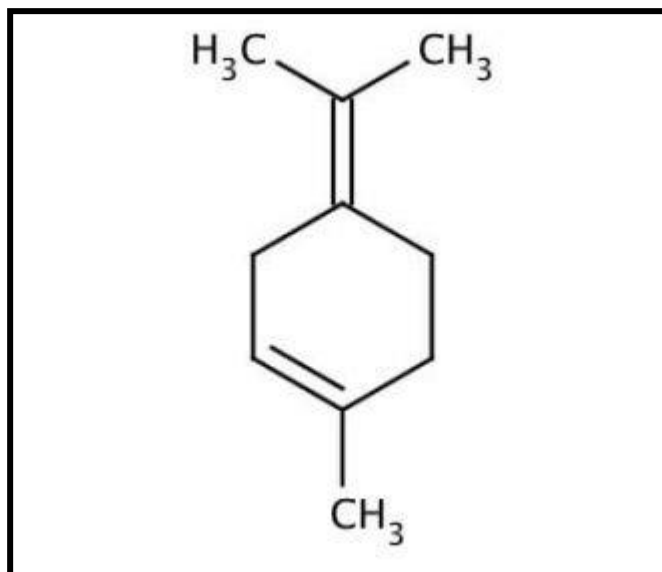


Figura 4: Estrutura química Terpinoleno. **Fonte:** Cymitquimica

Já o 1,8-Cineol (**Figura 5**), outro componente presente na composição química do óleo de melaleuca é um monoterpênóide bicíclico também conhecido como eucaliptol, comumente utilizado no tratamento de doenças respiratórias (Galan; 2020), contendo propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (Cai, et al; 2021).

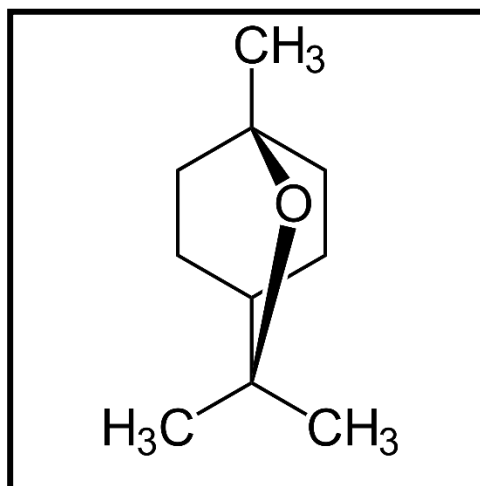


Figura 5: Estrutura química 1,8-Cineol. **Fonte:** Cymitquimica

A composição do TTO resulta em uma atividade antimicrobiana contra bactérias, fungos ou patógenos virais (Yasin, et al; 2021). De todas as propriedades presentes no TTO, seu efeito antimicrobiano recebeu o mais antigo relato do uso da planta *M. alternifolia* que explorou tal propriedade com o uso tradicional pelos aborígenes Bundjalung do norte de Nova Gales do Sul (Carson, Hammer & Riley, 2006; Cox, et al; 2001). Folhas eram esmagadas das “árvores

de chá” e inaladas para tratar tosses e resfriados, ou até mesmo borrifadas em feridas (Shemesh & Mayo; 1991).

O óleo de melaleuca é capaz de mudar a permeabilidade e a liquidez da membrana dos microorganismos nas espécies de *Candida albicans*. Alterações desse nível são associadas as conexões dos terpenos entre os ácidos graxos da membrana lipídica, causando assim uma fragilidade nas membranas celulares dos fungos e um excesso de trealose dentro da célula (Hammer, et al; 2002; Hammer, et al; 2012).

Por serem permeáveis ao óleo, esses organismos sofrem com a ação que inibe a respiração da célula, alterando a estrutura e desempenho da membrana, bem como a perda do material presente no interior da célula. Nesse caso acontece a morte dos fungos e das bactérias, e o impedimento do processo do aumento dos mesmos juntamente com o auxílio no combate a doenças (Hammer, et al; 2003; Azevedo; 2010).

É importante citar também que apesar de possuir três componentes principais que se destacam, o óleo de melaleuca puro possui também outros componentes, encontrados em menor concentração: p-Cimeno, Sabinene, Ledene e Limoneno (Lam, et al; 2020).

1.6 Nanotecnologia e Nanoemulsões

O avanço na ciência e tecnologia tem sido alvo de um crescimento exponencial significativo no mundo das pesquisas, tal avanço vem se mostrando como um fator de grande proveito e importância no mundo de hoje. Como destaque especial temos a ciência e tecnologia em nanoescala que vem causando notável atenção nos últimos tempos, devido a expectativa do impacto que materiais nanoestruturados podem gerar na melhora da qualidade de vida (como novos remédios, produtos de beleza, produtos agrícolas, etc) e na preservação ambiental (Roco, 2001).

A nanotecnologia voltada para a área farmacêutica é compreendida por desenvolver métodos terapêuticos juntamente com caracterizar e aplicar tudo em escalas nanométricas, com objetivo de maximizar o efeito terapêutico enquanto minimiza a toxicidade do fármaco (Chime, et al; 2014). Estudos de tais métodos são produzidos com o intuito de redirecionar os fármacos quando administrados em pacientes (Sakata, et al; 2007).

Oferecer vantagens promissoras na ciência é um dos objetivos da nanotecnologia, destacando-se: o poder de direcionar o medicamento a sítios específicos, também conhecido como sítio de especificidade onde o fármaco agirá no local exato de tratamento desejado (Pimentel, et al; 2007), a liberação controlada do fármaco através de estímulos do meio no qual o mesmo se encontra (sendo vulneráveis a diferenças de pH ou até mesmo de temperatura)

(Hammer, et al; 1998), quando no sistema terapêutico há a proteção do mesmo (Basha, et al; 2020), diminuição da dose terapêutica (Verma & Garg, 2001; Dunne et al; 2003) e também a chance de envolver tanto componentes hidrofílicas quanto lipofílicas (Tan & McClements; 2021).

Embora as vantagens citadas sejam significativas, algumas desvantagens estão presentes nos nanossistemas não podendo ser ignoradas, tais como: toxicidade (não frequente, mas relatada em alguns estudos), não biocompatibilidade com os materiais empregados e o alto custo financeiro na obtenção dos nanossistemas em comparação as formulações farmacêuticas existentes (Tao & Desai, 2003).

Dentro da nanotecnologia temos as nanoemulsões, que são dispersões de óleo em água (O/A), água em óleo (A/O) (**Figura 6**) de dois líquidos imiscíveis estabilizados com um surfactante apropriado (Mason, et al; 2006). Normalmente, o tamanho médio das gotas está entre 100 e 500nm (Chime, et al; 2014).

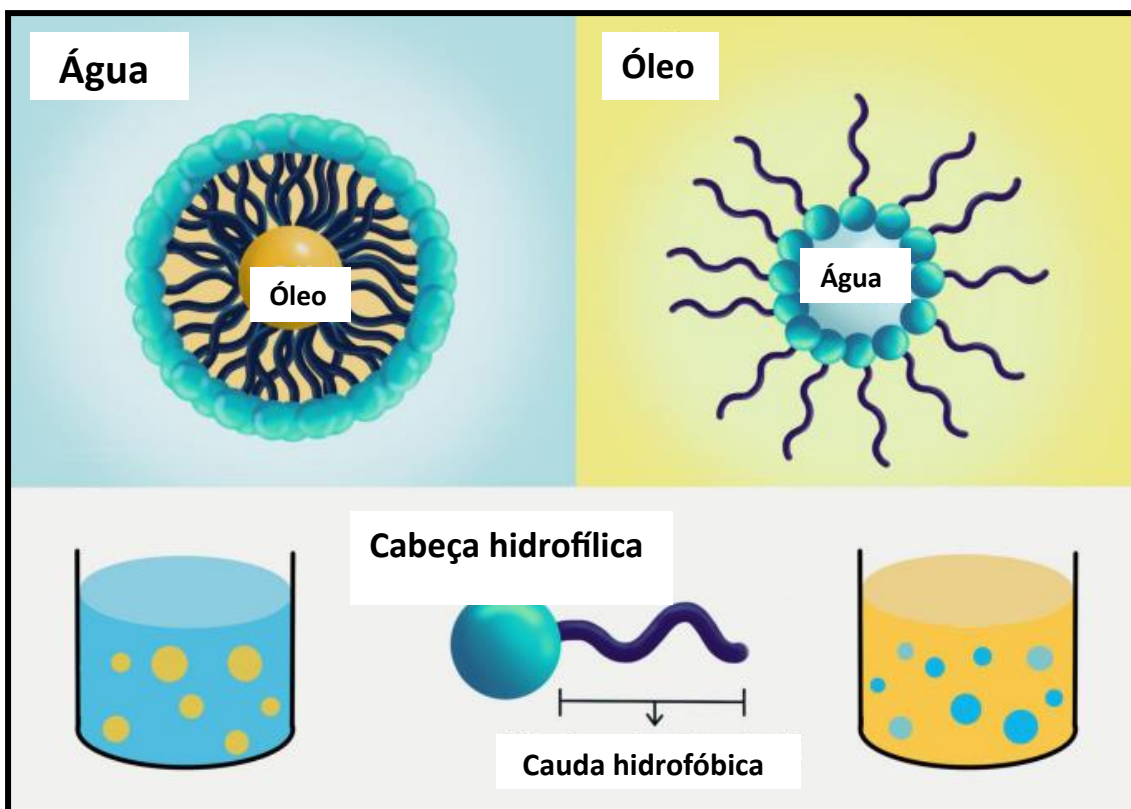


Figura 6 – Óleo em água e água em óleo em emulsões. Nanoemulsões estão desequilibrados sistemas de água em óleo (A/O) ou emulsões de óleo em água (O/A). eles são imiscíveis líquidos constituídos por óleo e água formando uma única fase por um emulsificante como os surfactantes e co-surfactantes, a combinação que confere alta termodinâmica, estabilidade e outras físico-químicas propriedades na emulsão. Adaptado: Ashaolu,2021.

As nanoemulsões podem ser apresentadas sob diversas formas de administração, tais como: líquidos (Tan, et al; 2015), cremes (Sharma, et al;

2013, Al-Edresi & Baie, 2009), sprays (Makidon, et al; 2010), géis (Lala & Awari, 2014; Hussain, et al; 2016), aerossóis (Nasr, Nawaz & Elhissi; 2012), espumas (Tamarkin, et al; 2007); podendo também ser administrado por vias variadas como: tópica (Mou, et al; 2008), via oral (Khani, Keyhanfar & Amani; 2016), via intravenosa (Pawar, et al; 2014), via intranasal (Bhanushali, et al; 2009), via pulmonar (Bhanushali, et al; 2009) e via ocular (Ammar, et al; 2009).

Possuem também maior capacidade de solubilização do que simples dispersões micelares, maior estabilidade cinética do que macroemulsões e têm encontrado uso na indústria de cosméticos (Yukuyama; 2016) fármacos e até mesmo pesticidas (Wang, et al; 2007).

As nanoemulsões podem ser produzidas utilizando diferentes métodos: Método de alta energia utilizados de forma ampla para formulações de nanoemulsões (Mahdi Jafari, et al; 2006), como exemplo, homogeneização de alta pressão (HAP) e ultrassonificação que possuem um gasto elevado de energia onde as gotas presentes são quebradas por cisalhamento gerado mecanicamente (Basha, et al; 2020).

Outro método utilizado é o de baixa energia, destaca-se a utilização de uma pequena quantidade de energia no preparo da formulação, necessitando apenas de agitação suave (Solans & Solé, 2012), utiliza-se de uma alta concentração de surfactantes mostram-se não viáveis para nanoemulsões alimentícias devido a alteração no sabor e segurança dos alimentos para consumo (Komaiko & McClements, 2016).

Os sistemas de administração de nanoemulsões se tornaram precursores de estudos devido seus benefícios promissores na nanotecnologia. O tamanho das gotículas auxilia que a nanoemulsão se mantenha dispersa sem que haja separação de fases (água/óleo) (Rutvij JP, et al; 2011), até o aumento da taxa de absorção do fármaco (Rutvij JP, et al; 2011).

É válido também mencionar que uma nanoemulsão é capaz de produzir uma proteção contra hidrólise e oxidação em se tratando de óleo em nanoemulsão, pois o mesmo não fica exposto ao ar ou água, que podem alterar a propriedade do óleo (Basha, et al; 2020). Nanoemulsões podem melhorar a estabilidade de compostos quimicamente instáveis, protegendo da degradação oxidativa e da degradação pela luz, possuindo uma liberação controlada do fármaco (Yashpal S, et al; 2013).

Sendo sistemas termodinamicamente instáveis (Charles & Attama; 2011), as nanoemulsões são compostas por dois líquidos imiscíveis misturados com agentes emulsificantes (surfactantes e co-surfactantes) formando assim uma única fase no preparo final. A nanoemulsão contém em sua composição: óleo, água e um emulsionante que auxilia no equilíbrio das nanoemulsões (Basha, et al; 2020).

Segundo a literatura para uma nanoemulsão de 20% (óleo em água), uma concentração de surfactante na região de 5 a 10% pode ser o suficiente para o preparo da formulação (Charles & Attama; 2011).

Para entender melhor como a estabilidade de uma nanoemulsão funciona alguns fatores são analisados (ex.: tamanho, quantidade de surfactantes utilizado etc), dentro destes se destaca a teoria do amadurecimento de Ostwald, observada por Ostwald em meados de 1896 ao qual se baseia na análise do crescimento do raio da gotícula e uma diminuição do número total das gotículas dispersas em uma nanoemulsão no decorrer do tempo (pós-preparo da formulação) (Franzol & Rezende; 2015).

Essa teoria se aplica como explicação para uma das limitações apresentadas pela nanoemulsão que é sua instabilidade (Kumar, et al; 2019), isto é, quando as propriedades físico-químicas que mantem a dispersão das gotículas na emulsão não são mantidas ao longo do tempo.

Outras limitações também estão presentes e podem afetar as nanoemulsões: floculação, sedimentação, coalescência (**Figura 7**) e alto custo financeiro no preparo dos nanocarreadores (Karthik, et al; 2017).

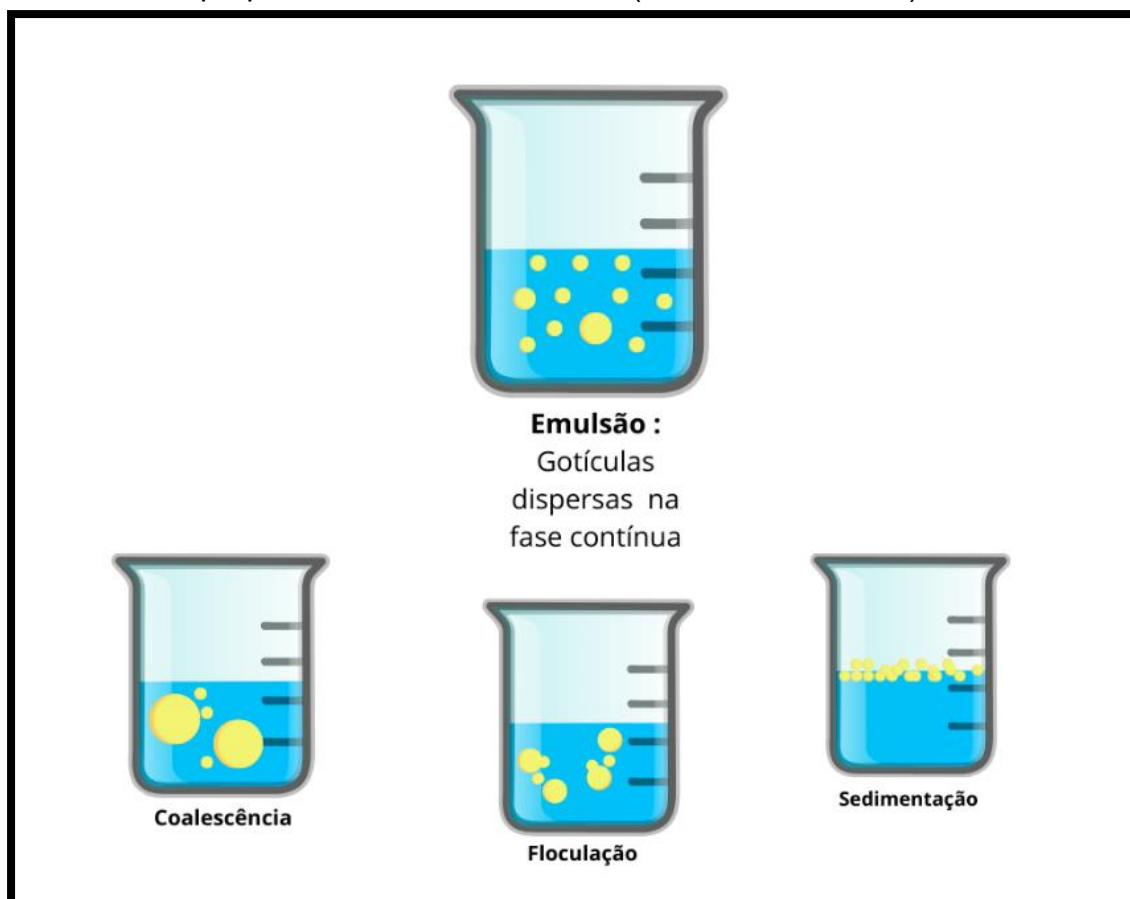


Figura 7: Tipos de separações que podem ocorrer a partir de uma emulsão. **Fonte:** Figura adaptada Franzol & Rezende; 2015.

A coalescência acontece quando as gotículas na nanoemulsão se juntam, formando gotículas maiores, isso pode ocorrer devido a diminuição da força repulsiva entre elas (Daltin; 2012). Já a sedimentação se destaca quando há uma diferença de densidade entre as duas fases resultando assim na sedimentação de uma das substâncias para o topo ou fundo da emulsão, esse processo pode ser revertido após agitação (Daltin; 2012; Rabinovich-Guilatt, et al; 2004; Tadros, 2004).

As colisões entre gotículas acarretam em floculação, as gotículas se agrupam em pequenos aglomerados, conhecidos como flocos, na floculação pode-se obter uma emulsão totalmente separada, também conhecida como quebra (Daltin; 2012).

As gotículas produzidas no preparo da nanoemulsão, são menores que as encontradas nas macroemulsões (100 a 1000nm), com isso, o movimento browniano (movimento aleatório das partículas que estão suspensas em um fluido) (Langevin; 1908) se apresentam dominantes em relação as forças gravitacionais, isso significa que a dispersão das nanopartículas dentro da nanoemulsão se dá de forma aleatória não seguindo um direcionamento de dispersão específico por influência da gravidade (Qian & McClements; 2011).

1.7 Surfactantes

Os surfactantes, ou agentes tensoativos, são comumente utilizados no preparo de nanoemulsões, representando uma classe de compostos cruciais para o preparo de formulações de nanoemulsão, capazes de modificar propriedades interfaciais entre diferentes fases, como água e óleo, esta característica única surge da sua estrutura anfifílica, apresentando regiões hidrofílicas e hidrofóbicas (Nitschke & Pastore; 2002).

As regiões hidrofílicas são atraídas pela água, enquanto as regiões hidrofóbicas são repelidas. Esta dupla natureza permite que os surfactantes reduzam a tensão superficial e melhorem a dispersão de substâncias em soluções aquosas (Silva, et al; 2015).

Os surfactantes encontram aplicações em vários setores devido às suas propriedades, dentro delas destacam-se: detergência, emulsificação em produtos domésticos e recuperação aprimorada de petróleo na indústria petrolífera. Os surfactantes desempenham um papel fundamental na definição da funcionalidade de vários produtos e processos (Rosen; 2004; Nitschke & Pastore; 2002; Desai & Banat; 1997).

Além disso os surfactantes apresentam grande aplicabilidade na área farmacêutica, o uso do mesmo é uma das principais maneiras de aumentar a solubilidade de fármacos (Silva, et al; 2015). Os surfactantes possuem atividade antibiótica e estudos investigam seu uso para combater fungos e bactérias (Shaban, et al; 2015)

1.8 Sistemas de medidas

1.8.1 Potencial Zeta

O Potencial Zeta se dá como um parâmetro presente dentro do sistema coloidal e na eletroquímica, representando o potencial elétrico no método de cisalhamento em torno de uma partícula carregada em um meio fluido (Pate & Safier; 2016). Ele desempenha um papel na compreensão da estabilidade, agregação e comportamento de sistemas coloidais. O potencial Zeta é uma medida da carga eletrostática na superfície de uma partícula e é influenciado por fatores como química da superfície, pH e força iônica do meio (Hunter; 1981; Lyklema; 1995).

Quando os valores obtidos no potencial zeta se apresentam elevados isso implica em uma dispersão mais estável na formulação, contudo valores baixos são indicadores característicos de instabilidade coloidal podendo levar a agregação das nanopartículas na nanoemulsão (**Tabela 1**) (Pate & Safier; 2016).

Tabela 1 Estabilidade coloidal para faixas de Potencial Zeta

Potencial Zeta	Estabilidade Coloidal
0 to _5	Rápida Aglomeração
_10 to _30	Baixa Estabilidade
_30 to _40	Estabilidade Moderada
_40 to _60	Boa Estabilidade
>_60	Excelente Estabilidade

Fonte: Métodos de metrologia química para qualidade CMP, 2016, K. Pate, P. Safier.

1.8.2 Índice de Polidispersão (PDI)

Assim como o Potencial Zeta, o Índice de Polidispersão (PDI) também é um parâmetro importante na caracterização das distribuições de tamanho de partículas, tendo maior destaque na ciência de coloidais e nanomateriais (Malvern Panalytical; 2018). O PDI quantifica a amplitude da distribuição de tamanho das partículas dentro de uma amostra, fornecendo informações sobre a uniformidade ou heterogeneidade do sistema (Berne & Pecora; 2000).

Os valores de PDI variam de 0 a 1, onde 0 indica um sistema monodisperso com tamanhos de partículas uniformes e 1 significa um sistema altamente polidisperso com uma alta variação de tamanhos de partículas (um

PDI baixo indica uma distribuição mais homogênea, enquanto um PDI alto sugere uma distribuição mais heterogênea) (Ottewill; 1963; Malvern Panalytical; 2004).

2. JUSTIFICATIVA

Sendo a CVV um dos maiores motivos patológicos aos quais tem levado mulheres a consultas ginecológicas para encontrar um tratamento eficaz, se dá como necessidade a busca por alternativas eficientes que demonstrem em sua ação um poder antifúngico que possa auxiliar contra tal patógeno. Medicamentos azólicos tem sido os mais prescritos por médicos em suas terapias de tratamento antifúngico, porém mesmo com seu alto grau de eficácia, tais medicamentos possuem um baixo desempenho, efeitos colaterais indesejados e são incapazes de parar casos recorrentes e até mesmo casos em que a resistência do fungo contra os azólicos se tornam maiores que seu poder de eficácia.

Com base nisso, a hipótese apresentada nesse estudo fundamenta-se em um tratamento alternativo, não agressivo, utilizando em sua composição o óleo essencial de melaleuca extraído da árvore também conhecida como *Tea Tree*, ao qual possui uma ação antifúngica testada e comprovada na literatura.

Para que seja administrada na região infectada por *Candida* será necessário o preparo de uma nanoemulsão contendo o óleo essencial de melaleuca, buscando assim encontrar uma terapia alternativa e sem efeitos colaterais indesejados para diminuir o crescimento fúngico ou até mesmo eliminá-lo por completo. Minimizando os casos existentes de CVV e CVVR, melhorando a vida das mulheres que sofrem por esta doença.

3.OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Preparar, padronizar e caracterizar nanoemulsão contendo Óleo de Melaleuca e avaliar a sua atividade antifúngica em *Candida albicans*.

3.1.1 Objetivos Específicos

- a)** Preparar e padronizar nanoemulsão contendo o óleo de melaleuca.
- b)** Caracterizar a nanoemulsão em função do seu tamanho, índice de polidispersão e potencial Zeta.
- c)** Avaliar a estabilidade da nanoemulsão no período de 30 dias.
- d)** Cultivar o fungo *C. albicans*. e realizar o teste de atividade antifúngica *in vitro*.
- e)** Avaliar a toxicidade da nanoemulsão por meio do teste de hemólise.

4. MÉTODOS

4.1 Padronização da Nanoemulsão de Óleo de Melaleuca

Para a padronização da nanoemulsão foram utilizadas adaptações do protocolo de Wei et al (2021), no preparo das formulações, para avaliar diferentes fatores e a resposta de cada um no momento da caracterização da mesma, tais como: quantidades variadas de surfactantes, utilização do ultra-turrax sem banho-maria invertido, utilização do ultra-turrax com banho-maria invertido, tempos diferentes de homogeneização e tempos diferentes de ultrassonificação.

As adaptações foram aplicadas:

Adaptação 1:

Para o preparo da nanoemulsão com óleo essencial de melaleuca, os seguintes passos foram realizados.

Em um béquer foram adicionados 500µL de óleo de melaleuca, 100µL de Tween 80 e 100µL de Span 80. Em seguida adicionou-se 9300µL de água ultrapura de forma constante, formando uma solução de cor branca e aspecto leitoso. Levou-se para a agitação em um ultra-turrax (IKA, T18, basic, Alpax), velocidade 4 (15.500 RPM) por 15 minutos e foi armazenado em frasco de vidro em temperatura de 2 °C a 8 °C.

A proporção total da nanoemulsão foi de 93% de água, 5% óleo e 2% de surfactantes.

Adaptação 2:

Em um béquer, foram adicionados 500µL de óleo de melaleuca, 150µL de Tween 80 e 150µL de Span 80. Em seguida adicionou-se 9300µL de água ultrapura de forma constante, formando uma solução de cor branca. Levou-se para a agitação em um ultra-turrax (IKA, T18, basic, Alpax), velocidade 4 (15.500 RPM) por 15 minutos e armazenado em frasco de vidro em temperatura de 2 °C a 8 °C.

Adaptação 3:

Em um béquer, foram adicionados 500µL de óleo de melaleuca, 210µL de Tween 80 e 210µL de Span 80 e adicionado. Em seguida adicionou-se 9300ul de água ultrapura de forma constante, formando uma solução de cor branca. Levou-se para a agitação em um ultra-turrax (IKA, T18, basic, Alpax), velocidade 4 (15.500 RPM) por 30 minutos e armazenado em frasco de vidro em temperatura de 2 °C a 8 °C.

Adaptação 4 (Protocolo final):

Foram adicionados com o auxílio de uma pipeta 400µL de Span 80 em um béquer com capacidade de 10 ml e em seguida no mesmo béquer foram acrescentados 500µL de óleo de melaleuca (comprado da empresa Terraflor Essencial). Em um outro béquer de 50 ml foram adicionados 400µL de Tween 80 e 9300µL de água ultrapura aquecida por 10 segundos no microondas em potência máxima (água morna). Ambos os béqueres contendo Span 80 + Óleo e Tween 80 + água ultrapura foram levados para o homogeneizador (sem aquecimento) por 15 minutos em agitação moderada.

Após os 15 minutos de homogeneização o béquer contendo Tween 80 + água ultrapura foi colocado em banho-maria invertido e levado ao ultra-turrax (IKA, T18 basic Apex), velocidade 4 (15.500 RPM) por 15 minutos, enquanto isso, foi adicionado aos poucos com auxílio de uma pipeta de 1000µL o Span 80 + óleo de melaleuca no béquer em ultrassonificação contendo Tween 80 + água ultrapura. Após a ultrassonificação, o preparo final (nanoemulsão) foi de uma solução de cor branca, aspecto leitoso, que em seguida foi armazenada em frasco de vidro transparente, limpo, fechado, identificado e levado para a geladeira ($\pm 4^{\circ}\text{C}$).

Para todos os testes foram utilizados a mesma marca de óleo essencial (Terraflor Essencial). Realizadas análises visuais do aspecto final da preparação da nanoemulsão e também foram feitas leituras de caracterização da nanoemulsão verificando seu tamanho, índice de polidispersão (PDI) e potencial Zeta (**Tabela 2**).

Tabela 2: Resumo dos parâmetros utilizados para análise de protocolos da nanoemulsão contendo óleo de melaleuca.

Protocolo	Água Ultrapura	Óleo de melaleuca	Tween 80	Span 80	Homogeneização	Ultrassonificação	Banho-maria Invertido
1	9300ul	500ul	100ul	100ul	15 minutos	30 minutos	Não
2	9300ul	500ul	150ul	150ul	15 minutos	30 minutos	Não
3	9300ul	500ul	210ul	210ul	15 minutos	30 minutos	Não
4	9300ul	500ul	400ul	400ul	15 minutos	15 minutos	Sim

4.1.1 Preparo das Nanopartículas Vazias (NV)

A técnica usada para o preparo das nanopartículas sem adição do óleo de melaleuca (NV) foi semelhante ao descrito no item 1, protocolo 4, substituindo-se o óleo de melaleuca por Triglicerídeo de Cadeia Livre (TCL) como controle negativo.

4.2 Caracterização da nanoemulsão

4.2.1 Tamanho, índice de polidispersão e potencial Zeta

As nanoemulsões foram analisadas quanto ao tamanho e índice de polidispersão (PDI) pela técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS). Para o potencial Zeta foi feito o procedimento de Espalhamento de Luz Eletroforético, todos realizados no equipamento Zetasizer (Malvern®).

4.2.2 Teste de estabilidade

Para o teste de estabilidade foram realizados cinco preparos da nanoemulsão (quintuplicata) seguindo adaptação 4 que foi escolhido para prosseguir nas análises. Cada preparo possui um volume final de 10600µl, foi separado em cinco frascos com 2100µl cada, identificados e armazenados na geladeira ($\pm 4^{\circ}\text{C}$). Para o teste foram realizadas cinco leituras nos seguintes tempos em dias: 1, 7, 14, 21 e 30, adaptado de Gostynska, et al (2023). Nestes tempos, foram realizados novamente as avaliações de diâmetro, PDI e potencial Zeta, conforme descrito anteriormente. Além destas, também foi acrescentada a observação visual para identificar qualquer possível alteração durante o passar dos dias após o preparo da nanoemulsão.

4.2.3 Teste de volume

Foram feitos três preparos (triplicata) da nanoemulsão com óleo de melaleuca e armazenados separadamente em frascos de vidro, mantidos um ao lado do outro, em temperatura ambiente, sem exposição de luz durante 30 dias, para a análise de volume da nanoemulsão utilizando a fórmula (Carneiro, et al; 2013):

Fórmula de volume (%): $H1/H0 \cdot 100$

Onde H1 representa volume final e H0 representa volume inicial.

4.3 Teste de atividade antifúngica *in vitro* para a nanoemulsão

4.3.1 Micro-organismo e Condições de Crescimento

O fungo *C. albicans* ATCC 10231 foi armazenado no Laboratório de Nano&Biotecnologia (LANAB), no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás com repiques semanais em meio de cultura ágar Sabouraud a temperatura de 37°C. Para os ensaios, o fungo foi cultivado em ágar Sabouraud por 24 horas a 37 °C.

4.3.2 Inóculo de *Candida albicans* para o Teste de Concentração Mínima Inibitória (CIM)

Para realizar o CIM foi preparado o inóculo de *C. albicans* em um eppendorf contendo 500µl de PBS e adicionado de 2 a 3 colônias de *C. albicans* cultivadas conforme descrito no subitem 3.1.

A partir da solução foi feita uma diluição de 1:100 (10µl da solução + 990µl PBS) e homogeneizada no vórtex. Na câmara de Neubauer, foi pipetado 10µl e contado nos quadrantes a quantidade de células encontradas com ajuda de um microscópio óptico, foi contado o 1º quadrante e multiplicado por 16 (quantidade total de quadrantes).

Cálculo para encontrar 1º concentração:

$$\text{Nº de células} \times 16 \cdot 10^4 \times 100 \text{ (Diluição)} = \text{Concentração inóculo (1} \cdot 10^9 \text{ células)}$$

Cálculo para encontrar 2º concentração:

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$[] \text{ Nº de células} \times V1 = 1 \times V2$$

De acordo com o CLSI a concentração final do inóculo após ser adicionado a placa de 96 poços deve ser de $0,5 \cdot 10^3$ a $2,5 \cdot 10^3$ UFC/ml, sendo que deve ser preparado no meio RPMI um inóculo concentrado 2x (de $1 \cdot 10^3$ a $5 \cdot 10^3$), pois este será diluído a 1:1 quando os poços forem inoculados.

4.3.3 Teste de Concentração Mínima Inibitória (CIM)

Para o teste de concentração mínima inibitória (CIM) foi preparado primeiramente o Fluconazol. Utilizando 10mg/ml de estreptomicina diluídos em PBS, obtendo a solução mãe, sendo adicionado em seguida 8,53µl da solução mãe em 991,4µl de RPMI, concentração inicial de 64 mg/ml. Em seguida foi preparado o inóculo 1×10^3 células, colocando em RPMI para a diluição final (10ml RPMI + 100ml do inóculo).

Para o preparo do óleo livre foi diluído 500µl óleo de Melaleuca + 500µl de PBS em um tubo eppendorf, levado ao vórtex por 1 minuto para homogeneização rápida.

Em uma placa de 96 poços de fundo chato, na primeira fileira da placa (A1 a A12) foram diluídos 500 µl + 500 µl RPMI, em seguida adicionados 200µl dos compostos em triplicata (Nanoemulsão de Óleo de Melaleuca, Nanoemulsão Vazia, Óleo Livre). Nas fileiras (B1-B12 a H1-H12) foi adicionado 100µl de RPMI, deixando apenas a fileira "A" sem meio. Sendo que, a partir dos poços da linha "A", foi realizado a diluição seriada dos compostos e das nanopartículas ao longo das colunas. A diluição é feita transferindo 100µl do poço anterior para o poço seguinte, sendo que no último poço da coluna os 100ul são descartados.

Para o controle do RPMI (negativo) foi utilizado apenas o meio RPMI e para o controle de crescimento fúngico (positivo) foi utilizado meio RPMI + Inóculo com *C. albicans*. Após todas as diluições serem realizadas, foi acrescentado 100µl de RPMI + Inóculo em todos os poços exceto controle negativo. As placas foram identificadas e fechadas com plástico filme. Incubado a 37°C por 48 horas. Sendo observado nos intervalos de 24 horas e 48 horas.

4.4. Ensaio de Toxicidade

4.4.1 Teste de Hemólise

O teste de hemólise foi realizado com o objetivo de se avaliar a segurança do uso da nanoemulsão contendo óleo de melaleuca, da nanopartícula vazia, óleo livre e fluconazol.

Para o teste foi coletado 4ml de sangue periférico, em tubos de EDTA, em seguida centrifugado por 8 minutos a 1500 RPM para separação das hemácias, logo após pegou-se 1,5ml do concentrado de hemácia e foi lavado em PBS três vezes a cada centrifugação (8 minutos, 1500 RPM) e ressuspendeu-se em PBS 1:3, 66ml. Diluiu-se as hemácias 3:11 (volume: volume) em PBS, adicionando 10 ml nas placas de 96 poços com fundo em V, sendo antes os poços identificados quanto aos componentes do teste.

Os compostos e as nanopartículas foram diluídos em PBS, 90ml dos compostos foram adicionados em triplicata. Em seguida a placa foi incubada a 37°C por 1 hora. Logo então a placa foi centrifugada por 10 minutos a 2000 RPM, foi coletado o sobrenadante e transferido para outra placa de fundo plano e deixado por 30 minutos em temperatura ambiente para a oxidação da hemoglobina. No final foi realizada a leitura de absorvância em espectro à 545nm.

A porcentagem de hemólise obtida foi calculada através da equação:

$$\%H = \frac{\text{Absorbância Amostra} - \text{Controle Negativo} \times 100}{\text{Absorbância Controle Positivo}}$$

4.5 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o cálculo de média e desvio padrão dos resultados obtidos.

5. RESULTADOS

5.1 Comparação entre os protocolos avaliados

5.1.1 Padronização da Nanoemulsão Óleo de Melaleuca

Protocolo 1

O primeiro preparo feito a partir da adaptação 1, foi realizado no total de 8 vezes, em dias alternados. Na sequência todas as nanoemulsões foram caracterizadas através da leitura analisando tamanho, PDI e potencial Zeta. A necessidade de analisar os parâmetros encontrados no preparo de cada nanoemulsão foi para saber como as nanopartículas estavam se comportando dentro da nanoemulsão, e como se comportarão com o passar dos dias após o preparo, para que haja uma comparação com os preparos e resultados do presente estudo. Foram obtidos os seguintes resultados (**Tabela 3**):

Tabela 3: Valores encontrados na adaptação 1 após caracterização da nanoemulsão.

Data	Tamanho	PDI	Potencial Zeta
31/05/2022	29,98	1,371	-5,637
23/06/2022	0,4879	0,4421	-6,453
30/06/2022	58,15	1,614	-9,146
04/07/2022	73,96	1,643	-17,53
18/07/2022	80,64	0,5689	-7,128
22/07/2022	176,8	0,2878	-8,831
12/09/2022	20,36	0,6283	-7,183
13/09/2022	62,31	1,631	-9,205
Média final	62,83	1,02	-8,88

Protocolo 2

Uma nova adaptação foi realizada, no intuito de obter novos parâmetros para a padronização da nanoemulsão, os resultados obtidos na adaptação 2 foram (**Tabela 4**).

Tabela 4: Valores encontrados na adaptação 2 após caracterização da nanoemulsão.

Data	Tamanho	PDI	Potencial Zeta
14/09/2022	1,776	0,2157	0,01514
15/09/2022	0,03067	0,2379	-1,621
16/09/2022	2,2	0,2108	-1,897
Média final	1,42	0,22	-1,16

Protocolo 3

Na adaptação 3 foi adicionado a quantidade de 210 μ L de ambos os surfactantes para análise do resultado final obtido (**Tabela 5**).

Tabela 5: Valores encontrados na adaptação 3 após caracterização da nanoemulsão.

Data	Tamanho	PDI	Potencial Zeta
30/09/2022	5,086	0,2497	-8,361
17/10/2022	11,36	0,3899	-8,873
20/10/2022	9,4	0,3947	-9,268
03/11/2022	5,272	0,4646	-1,1
Média final	7,77	0,37	-6,90

Levando em consideração que os mesmos parâmetros de tempo de homogeneização e ultrassonificação estavam sendo seguidos, mostrou-se necessário que um novo teste fosse realizado, reduzindo o tempo de ultrassonificação pela metade (15 minutos), adicionando o banho-maria invertido, e alterando a quantidade de surfactante adicionado, sendo 400 μ L de Tween 80 e 400 μ L de Span 80. O protocolo em questão foi nomeado como protocolo 4 (final) onde valores satisfatórios foram obtidos para dar continuidade as análises propostas no trabalho.

Protocolo 4 (final)

Os resultados da leitura da nanoemulsão da adaptação 4, foram os melhores valores obtidos dentro de todos os testes realizados. Obteve-se uma nanoemulsão de cor branca, aspecto leitoso e sem anel de sedimentação, tais resultados levaram a adaptação 4 a ser o protocolo final para dar continuidade com as análises propostas no trabalho (**Figura 8**).



Figura 8: Nanoemulsão contendo óleo de melaleuca, com coloração branca e aspecto leitoso, sem anel de sedimentação, ambos os frascos são do mesmo protocolo (4) e foram armazenados em temperatura 2 °C a 8 °C.

As médias dos valores obtidos em triplicata com o preparo do protocolo 4 (**Tabela 6**), foram:

Tabela 6: Valores encontrados na adaptação 4 após caracterização da nanoemulsão.

Data	Tamanho	PDI	Potencial Zeta
30/08/2023	15,74	0,4	-25,29
05/09/2023	16,44	0,3	-23,54
06/09/2023	11,47	0,3	- 21,5
Média final	14,55	0,3	-23,44

É válido destacar que apesar de uma média ter sido obtida na padronização da leitura da nanoemulsão, os diâmetros encontrados das nanopartículas dispersas na NOM, tiveram uma variação em seu grupo populacional, isto é, foram encontrados valores que variam entre 15nm a 100nm (**Figura 9**).

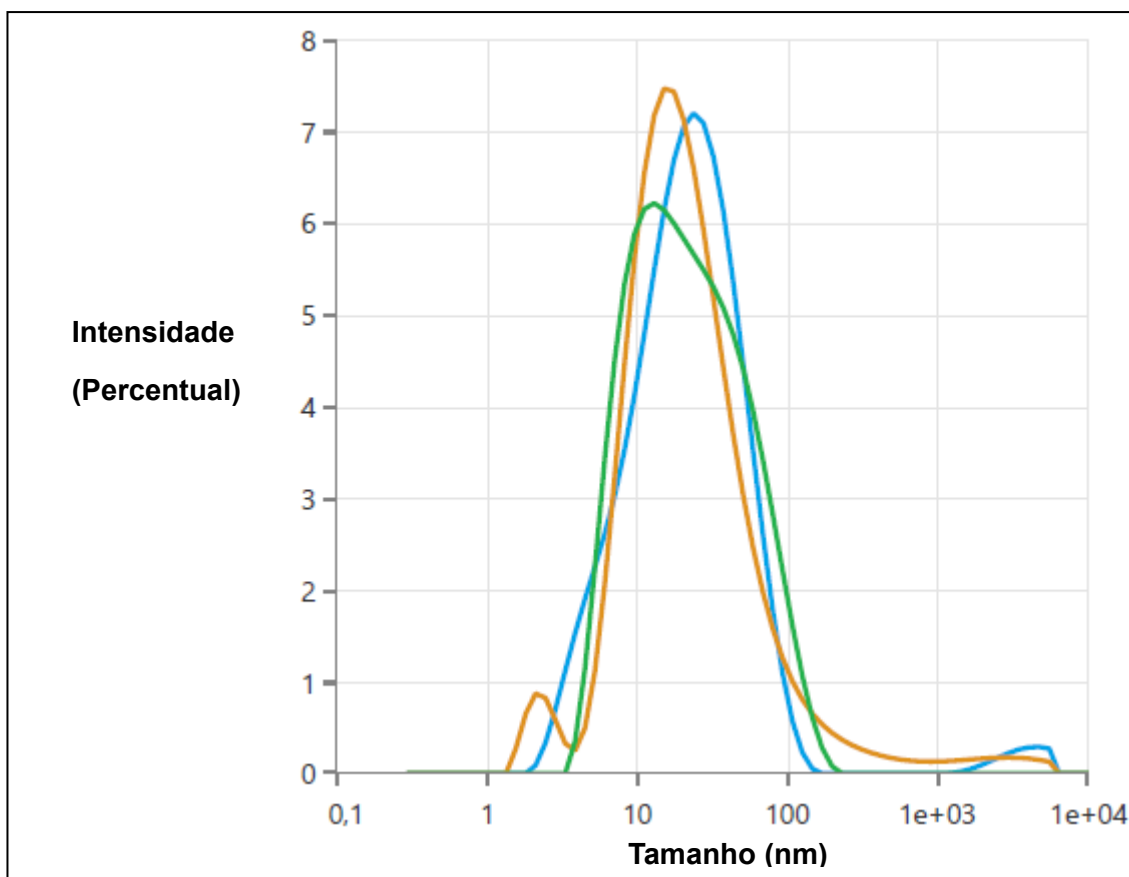


Figura 9: Gráfico indicando a variação populacional em porcentagem dos tamanhos encontrados na leitura de caracterização e padronização da NOM, tamanhos que variam de 15nm a 100nm.

Após obter resultados satisfatórios e padronizar a nanoemulsão seguiu-se para o teste de estabilidade no período de 30 dias.

5.2 Preparo das Nanopartículas Vazias (NV)

A técnica utilizada no preparo da Nanoemulsão Vazia (NV), se deu sem adição do Óleo de Melaleuca (NOM) sendo o preparo semelhante ao descrito no protocolo final da nanoemulsão de óleo de melaleuca, substituindo-se o óleo de melaleuca por Triglicerídeo de Cadeia Livre (TCL), no final obteve-se uma nanoemulsão de cor semelhante ao da nanoemulsão contendo óleo de melaleuca, sem anel de sedimentação ou precipitação. Sendo o mesmo utilizado no CIM e teste de hemólise.

5.3 Teste de estabilidade

Para o teste de estabilidade foi realizado uma quintuplicata com a nanoemulsão de óleo de melaleuca e os resultados obtidos foram tabulados em média e desvio padrão a partir de cada característica analisada (**Tabela 7, 8, 9, 10 e 11**).

Tabela 7: Teste de Estabilidade 30 dias e Média e Desvio Padrão dos resultados finais, dia 1.

Dia 1			
Preparo	Tamanho	PDI	Potencial Zeta
1	15,74	0,4	-25,29
2	16,44	0,3	-23,54
3	11,47	0,3	-21,5
4	16,08	0,3	-22,01
5	15,51	0,3	-20,63

	Média	Desvio Padrão
Tamanho	15,04	1,8
PDI	0,3	0
Potencial Zeta	-22,59	1,6

Tabela 8: Teste de Estabilidade 30 dias e Média e Desvio Padrão dos resultados finais

Dia 7			
Preparo	Tamanho	PDI	Potencial Zeta
1	15,98	0,4	-22,36
2	19,25	0,4	-21,8
3	21,5	0,4	-20,81
4	14,2	0,3	-22,01
5	13,95	0,3	-21,07

	Média	Desvio Padrão
Tamanho	16,97	2,9
PDI	0,36	0
Potencial Zeta	-21,61	0,5

Tabela 9: Teste de Estabilidade 30 dias e Média e Desvio Padrão dos resultados finais

Dia 14			
Preparo	Tamanho	PDI	Potencial Zeta
1	16,71	0,4	- 20,55
2	23,36	0,4	-21,8
3	11,98	0,3	-20,79
4	14,55	0,3	-20,42
5	13,46	0,3	-18,75

	Média	Desvio Padrão
Tamanho	16,01	3,9
PDI	0,34	0
Potencial Zeta	-20,46	0,9

Tabela 10: Teste de Estabilidade 30 dias e Média e Desvio Padrão dos resultados finais

Dia 21			
Preparo	Diâmetro	PDI	Potencial Zeta
1	22,69	0,4	-22,24
2	20,83	0,4	-21,9
3	11,41	0,3	-20,44
4	14,16	0,3	-19,68
5	13,45	0,3	-18,96

	Média	Desvio Padrão
Tamanho	16,50	4,4
PDI	0,34	0
Potencial Zeta	-20,64	1,2

Tabela 11: Teste de Estabilidade 30 dias e Média e Desvio Padrão dos resultados finais

Dia 30			
Preparo	Diâmetro	PDI	Potencial Zeta
1	17,85	0,4	-20,63
2	17,39	0,3	-21,07
3	14,28	0,3	-18,75
4	13,79	0,4	-18,96
5	12,13	0,3	-19,46

	Média	Desvio Padrão
Diâmetro	15,08	2,1
PDI	0,34	0
Potencial Zeta	-19,77	0,9

Nenhuma alteração visual foi encontrada e a nanoemulsão manteve seu aspecto visual normal durante os dias que se passaram.

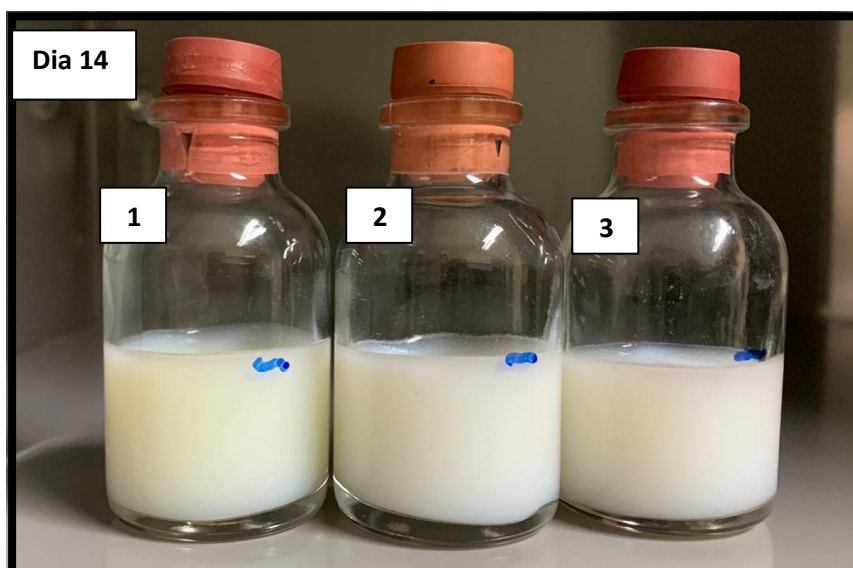
5.4 Teste de volume

Foi analisado no período de 14 dias e logo em seguida foi realizado o cálculo com a fórmula de volume (**Figura 10 e 11**).

Figura 10: Nanoemulsão contendo Óleo de Melaleuca, em temperatura ambiente longe da exposição a luz solar, Dia 1.



Figura 11: Nanoemulsão contendo Óleo de Melaleuca, em temperatura ambiente longe da exposição a luz solar, Dia 14.



Valores em porcentagem, obtidos após cálculos utilizando a fórmula de volume, análise realizada no 14º dia (**Tabela 12**):

Tabela 12: Resultados dos cálculos realizados com a fórmula de volume

	Resultado
Preparo 1	100%
Preparo 2	100%
Preparo 3	99,05%

Levando em conta os cálculos efetuados e a parte visual, constatou-se que ao final obteve-se uma média de 99,68% de volume após 14 dias em comparação com seu volume inicial do preparo.

5.5 Teste de Concentração Mínima Inibitória (CIM)

Nas nanopartículas analisadas no teste por CIM, foram observados que no período de 24 horas após experimento, apenas a concentração inicial da nanoemulsão contendo óleo de melaleuca, óleo livre e fluconazol a 64 μ g/mL (faixa entre 0,125 e 64 μ g/mL, padronizada segundo o CLSI M27A2), não apresentaram crescimento fúngico nos poços, já na nanoemulsão vazia houve crescimento total em todos os poços. Após 48 horas, uma nova análise visual foi realizada, e como resultado final constatou-se que apenas a coluna 1 a 3, na linha A, dos compostos NOM e colunas 10 a 12, linha A, do fluconazol se mostraram agentes antifúngicos em ação a *C albicans* ATCC 10231. Controle negativo se manteve normal sem crescimento do fungo e o controle positivo houve o crescimento do fungo, conforme esperado.

5.6 Teste de Hemólise

O teste de hemólise foi realizado para o óleo livre, nanoemulsão contendo óleo de melaleuca, nanopartícula vazia e fluconazol (**Figuras 12 e 13**).

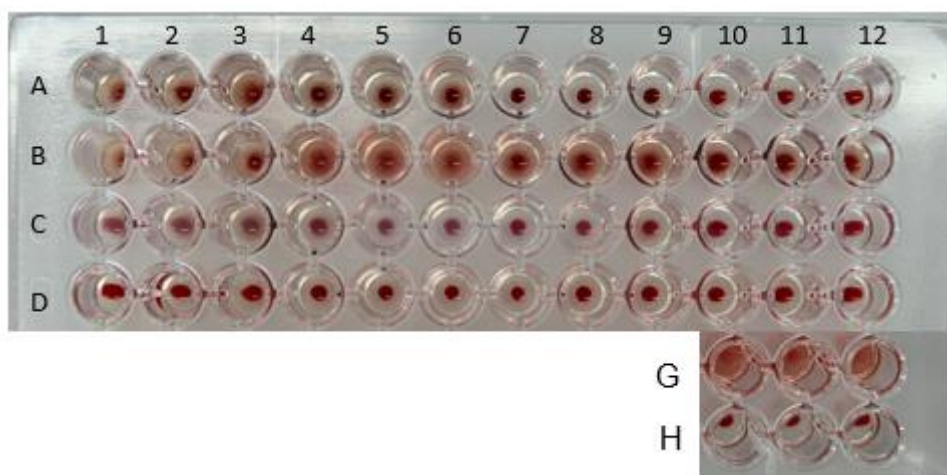


Figura 12: Placa de 96 poços do teste de hemólise após centrifugação. Placa 1, onde foram realizadas as primeiras diluições seriadas a partir da solução “mãe”, todos realizados em triplicata.

Conforme figura 7, no teste com nanoemulsão com óleo de melaleuca linha A, coluna 1 a 6 observou-se que a concentração analisada se mostrou tóxica, já nas concentrações da coluna 7 em diante não houve toxicidade encontrada, seguindo assim também na placa 2 que é a continuação da diluição seriada do composto iniciada na placa 1.

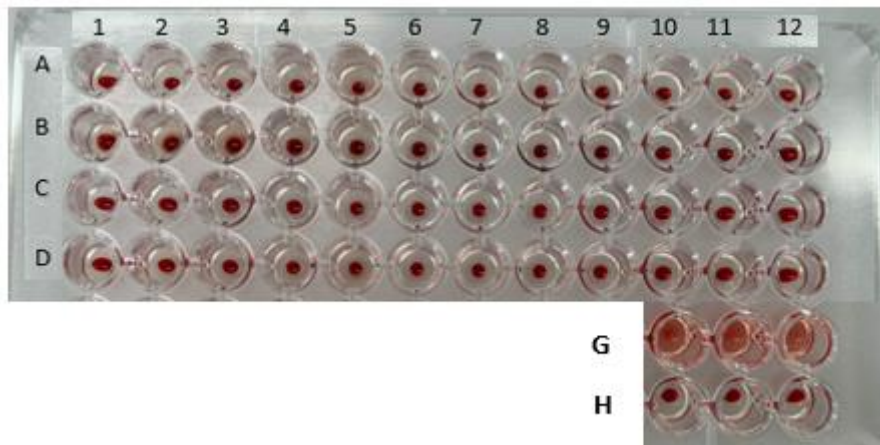
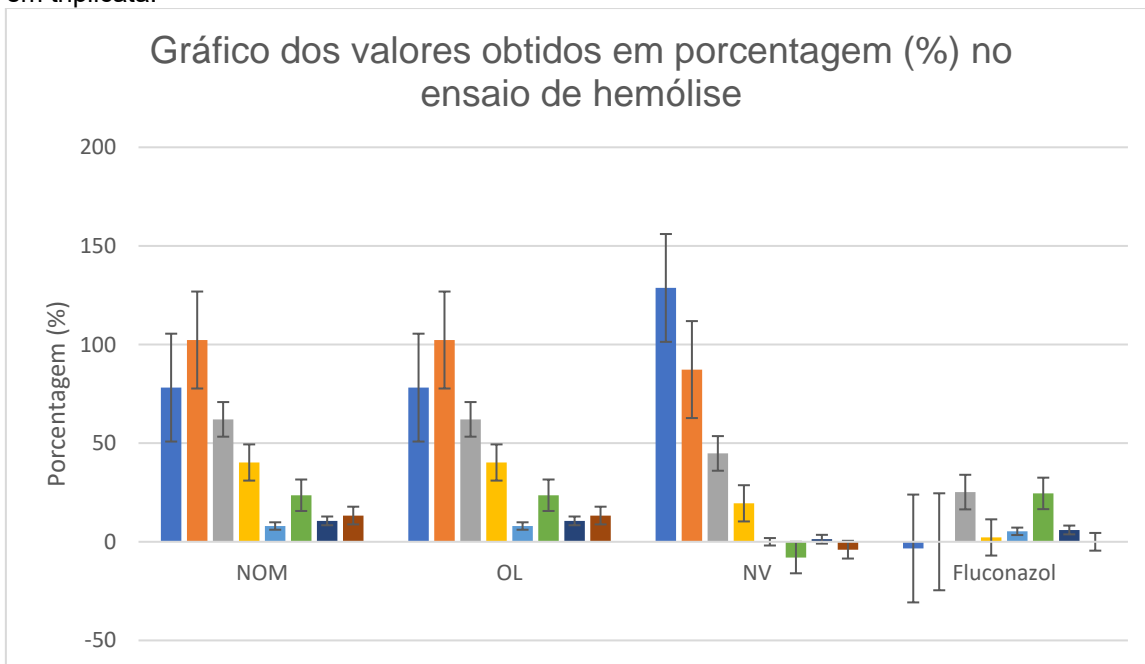


Figura 13: Placa de 96 poços do teste de hemólise após centrifugação. Placa 2, sendo a continuação as diluições seriadas a partir da Placa 1, todos realizados em triplicata.

Legenda: Figura 4 e 5, respectivamente Placa 1 e 2, foram parametrizadas da seguinte forma: Linha A/ Nanoemulsão com óleo de melaleuca. Linha B/ Nanoemulsão Vazia. Linha C/ Óleo livre. Linha D/ Fluconazol. Linha G/ Coluna 10 a 12, Controle positivo. Linha H/ Coluna 10 a 12, Controle Negativo. Sendo placa 1 o início das diluições seriadas e a placa dois o fim.

Já na linha B, todos os testes se mostraram tóxicos, se tratando da nanopartícula vazia, sendo apenas na placa 2 a partir da coluna 4 a ausência de toxicidade mediante o composto analisado. Portanto na linha C, onde foi analisado o óleo livre, constatou-se que apenas a primeira triplicata com a concentração inicial se mostrou tóxica no teste, sendo os poços seguintes ausentes de toxicidade nas hemácias. E por fim a linha D, ao qual foi testado o Fluconazol ontem apenas a triplicata inicial (Coluna 1 a 3) foi apresentada toxicidade, seguindo semelhante padrão encontrado no teste da linha C com o óleo livre (**Figura 14**).

Figura 14: Valores obtidos em porcentagem (%) no ensaio de hemólise, resultados apresentados com desvio padrão do ensaio de hemólise, com o teste dos compostos realizados em triplicata.



6. DISCUSSÃO

A nanotecnologia tem causado grande impacto devido suas nanoestruturas que podem fornecer uma melhora na qualidade de vida e na preservação ambiental (Roco; 2001). Já as nanopartículas são consideradas o alvo principal da nanotecnologia, pois sua aplicabilidade tem sido alvo de estudos para atuar na evolução terapêutica de fármacos (Ferreira & Rangel; 2009).

O óleo de melaleuca que possui um notório poder antifúngico devido seu componente principal o terpin-4-ol, já vem se mostrando um grande aliado nos estudos de ação contra doenças fúngicas (Flores, et al; 2015), ganhando seu destaque no tratamento de fungos do gênero *Candida* e sendo um importante agente terapêutico experimental contra a CVV e CVVR (Hammer *et al*, 2002, Hammer, *et al*; 2012; Flores, et al; 2015; Roana, et al; 2020).

Baseado nas informações disponíveis na literatura o fator funcional da nanoemulsão utilizando óleo essencial de melaleuca ou até mesmo de outros óleos essenciais existentes, depende de alguns fatores, tais como: Composição do óleo, diâmetro da gota da nanopartícula, surfactantes e energia empregada durante o preparo (Tan & McClements; 2021).

Foi analisado no presente estudo que quanto maior o tempo aplicado de ultrassonificação (energia aplicada) no preparo da nanoemulsão, menor o valor do tamanho encontrado, conseqüentemente os resultados obtidos de potencial Zeta eram de valores abaixo do esperado que variavam de 0,0015 a -9,0mV, chegando até mesmo em alguns casos não serem encontrados valores devido ao tamanho da nanopartícula que estava em uma escala nanométrica muito pequena (Basha, et al; 2020). Entendendo-se assim que seria necessário que o tamanho das nanopartículas se tornasse maiores para que houvesse um potencial Zeta que pudesse alcançar resultados satisfatórios (acima de 20mV) conforme literatura, para que não houvesse uma rápida aglomeração das nanopartículas dentro da nanoemulsão (Pate & Safier; 2016).

Apresentou-se nos resultados da adaptação 4 (protocolo final) os valores de média de diâmetro que variam de 15nm a 100nm, em comparação com trabalhos descritos onde são relatados valores que variavam entre 200 a 3,97nm, notando-se uma proximidade em relação aos resultados obtidos no estudo (Flores, et al; 2015; Wei, et al; 2021).

Apesar da média final encontrada na caracterização da nanoemulsão do óleo de melaleuca ter sido de 15,74nm, foi visto que outros picos de intensidade de diferentes valores de tamanho foram obtidos como resultado, esses valores existem devido a forma de obtenção dos resultados analisados no equipamento

Zetasizer que disponibiliza o tamanho das nanopartículas em forma de média, com isso foi possível analisar diferentes grupos populacionais de tamanhos de nanopartículas dentro da nanoemulsão, concluindo que as nanopartículas estão dispersas de forma heterógena dentro da formulação (Ferreira & Rangel; 2009; Basha, et al; 2020).

Baseado nos dados obtidos e nas propriedades físicas que se mostraram próximas com os resultados encontrados em outras bases literárias (Wei, et al; 2021), a análise da nanoemulsão seguiu para o teste de estabilidade levando em consideração os valores de média encontrados do potencial Zeta, tamanho e PDI que foram respectivamente -25,49mV, 14,55nm e 03 sendo classificado como baixa estabilidade, porém aceitável para estudo (Pate & Safier; 2016).

Para o teste de estabilidade foram feitas leituras de caracterização observando tamanho, potencial Zeta e PDI, notou-se uma alteração nos valores obtidos que se seguiram entre os dias 1 ao 30, essas variações trazem à tona a condição de um sistema termodinamicamente instável, em outras palavras, um processo não espontâneo, que pode gerar a separação da emulsão com o passar do tempo segundo relatos da literatura (Rezende & Franzol; 2015).

Para uma melhor explicação sobre a variação dos resultados de tamanho e potencial Zeta que sofreram alteração com o passar dos dias é possível destacar a teoria de Ostwald como precursora da instabilidade da nanoemulsão (Rezende & Franzol; 2015), as nanoemulsões analisadas não tiveram separação da emulsão no período do teste de estabilidade, ambas as nanoemulsões se apresentaram iguais visualmente em comparação ao dia do preparo.

No teste antifúngico (CIM) foi analisado que o Fluconazol já parametrizado (NCCLS, 2002) a 64mg/ml se mostrou eficaz e não houve crescimento fúngico no poço da concentração inicial, o mesmo se deu a NOM onde foi possível notar a ação antifúngica do composto sobre o fungo. Já os outros compostos analisados obtiveram crescimento visível do fungo *C albicans* ATCC10231.

O teste de toxicidade através do teste de hemólise, as amostras de nanoemulsão com óleo de melaleuca, se mostraram tóxicas apenas nas concentrações 64mg/ml e 32mg/ml, nas concentrações seguintes a NOM se mostrou não tóxica. Na amostra de nanoemulsão vazia toda a placa 1 foi considerada tóxica após análise e a placa 2 não houve toxicidade. Nas amostras de óleo livre e fluconazol apenas a 1º concentração testada se mostrou tóxica no teste. Controle negativo se apresentou sem toxicidade e controle positivo apresentou lise celular conforme o esperado.

Apesar dos surfactantes desempenharem um papel fundamental na definição da funcionalidade de vários produtos e processos, possuindo a

capacidade de modificar propriedades interfaciais entre diferentes fases, como água e óleo, e ser bastante utilizado no preparo de nanoemulsões (Rosen; 2004), a quantidade empregada na NOM pode ser um dos fatores a se considerar em se tratando da toxicidade e da hemólise no teste efetuado, com isso mostra-se plausível que testes *in vivo* sejam realizados para analisar se de fato a nanoemulsão se mostra tóxica em ambos os testes.

A comparação dos resultados obtidos, nos mostra que os testes de padronização da nanoemulsão se mostraram satisfatórios em relação ao comportamento das nanopartículas com o passar do tempo, porém se tratando dos testes *in vitro* conclui-se que não são capazes de afirmar com veracidade a eficácia da nanoemulsão em futuros testes *in vivo*. Para que haja resultados positivos novos testes precisam ser realizados, para uma melhor análise.

7. CONCLUSÃO

Uma formulação de nanoemulsão contendo óleo de melaleuca foi preparada e padronizada com tamanho e potencial zeta uniformes, verificou-se sua estabilidade em um período de 30 dias e os resultados obtidos foram satisfatórios para que se seguissem para os próximos passos propostos pelo estudo. Foi definido a concentração mínima inibitória pelo método de microdiluição em caldo para o óleo de melaleuca e fluconazol, avaliando o efeito das nanoestruturas com óleo em *Candida albicans* ATCC 10231 o que se mostraram promissoras pois concluiu-se que a NOM era fungistática em sua concentração inicial, foi realizado também teste de hemólise para analisar sua citotoxicidade onde foram verificadas lise celular na concentração inicial da NOM. Com isso espera-se que estudos futuros sejam conduzidos para avaliar melhor a formulação da nanoemulsão para prosseguir os estudos em ensaios *in vivo*.

8. PERSPECTIVAS

Para a complementação do presente estudo propõe-se que sejam repetidos os testes *in vitro* com o intuito de avaliar melhor a segurança da formulação (citotoxicidade) contendo óleo de melaleuca e também iniciar testes com a nanoemulsão em experimentos *in vivo*.

9. REFERÊNCIAS

1. Akins, R. A. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Medical Mycology*, 43(4), 285-318. 2005.
2. Al-Edresi S, S. Baie, Formulation and stability of whitening VCO-in-water nanocream, *Int. J. Pharm.* 373, 174–178. 2009
3. Álvares CA, Svidzinski TIE, Consolaro MEL. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 43:319-27. 2007
4. Ammar HO, H.A. Salama, M. Ghorab, A.A. Mahmoud, Nanoemulsion as a potential ophthalmic delivery system for dorzolamide hydrochloride, *AAPS PharmSciTech* 10. 2009.
5. Angélica Franzol e Mirabel Cerqueira Rezende. Estabilidade de emulsões: um estudo de caso envolvendo emulsionantes aniônico, catiônico e não-iônico. *Polímeros*, 25(número especial), 1-9, 2015.
6. Azevedo, S.M.A. <<http://www.lemnifarmacia.com.br/oleo-de-melaleuca-tea-tree-oil-um-poderoso-antisseptico-germicida-e-fungicida-natural/>> acesso dia 23 de agosto de 2014.
7. Aydin, E.; Türkez, H.; Taşdemir, S. Anticancer and Antioxidant Properties of Terpinolene in Rat Brain Cells. *Arh. Hig. Rada. Toksikol*, 64, 415–424. 2013
8. Barbedo LS, Sgarbi DBG. Candidíase. *Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis*, Rio de Janeiro. 22(1):22-38. 2010.
9. Basha S. Khaleel, M. Syed Muzammil, R. Dhandayuthabani, V. Sugantha Kumari² and K. Kaviyarasu^{3,4} Nanoemulsion as Oral Drug Delivery - A Review *Current Drug Research Reviews*. 2020.
10. Bennett RN, Wallsgrave RM. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist*. 127(4):617-33. 1994
11. Berne, B. J., & Pecora, R. "Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics." *Dover Publications*. ISBN-13: 978-0486419630. 2000.
12. Bizzo, h.r.; hovell, a. M.c.; rezende, c.m., - Óleos Essenciais no Brasil: Aspectos Gerais, Desenvolvimento e Perspectivas - *Quim. Nova*, Vol. 32 nº 3, p. 588-594. 2009.
13. Bhanushali RS, M.M. Gatne, R.V. Gaikwad, A.N. Bajaj, M.A. Morde, Nanoemulsion based intranasal delivery of antimigraine drugs for nose to brain targeting, *Indian J. Pharm. Sci.* 71, 707–709. 2009

- 14.**Brasil. Ministério da Saúde. Portal da Saúde (Brasil). Portaria nº. 533, de 28 de março de 2012. Estabelece o elenco de medicamentos e insumos da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). Diário Oficial da União 29 de março de 2012; Seção 1. 2012.
- 13.**Brigger, i.; dubernet, c.; couvreur, p. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv. Drug Del. Rev.*, Arlington, v.54, p.631-651, 2002.
- 14.**Cai, Z.-M.; Peng, J.-Q.; Chen, Y.; Tao, L.; Zhang, Y.-Y.; Fu, L.-Y.; Long, Q.-D.; Shen, X.-C. 1,8- Cineole: A Review of Source, Biological Activities, and Application. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 23, 938–954.2021.
- 15.**Calderone, R. A., & Clancy, C. J. (Eds.). *Candida and candidiasis*. American Society for Microbiology Press. 2011.
- 16.**Carneiro, H. C. F., Tonon, R. V., Grosso, C. R. F., and Hubinger, M. D. Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. *J. Food Eng.* 115. 2013
- 17.**Carson, C.F.; Hammer, K.A.; Riley, T.V. Melaleuca alternifolia (Tea Tree) Oil: A Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 50–62. 2006.
- 18.**Carvalho VO, Okay TS, Melhem MSC, Szeszsc WM, Del Negro GM. The new mutation L321F in *Candida albicans* ERG11 gene may be associated with fluconazole resistance. *Rev Iberoam Micol.* 2013.
- 19.**Conti, H.R., Huppler, A.R., Whibley, N. & Gaffen, S.L. Animal models for Candidiasis. *fCurr. Protoc. Immunol.* 105, 19.6.1–19.6.17.2014.
- 20.**Cole AM. Innate host defense of human vaginal and cervical mucosae. *Curr Top Microbiol Immunol.*306:199-230.2006
- 21.**Cox, S.D.; Mann, C.M.; Markham, J.L.; Gustafson, J.E.; Warmington, J.R.; Wyllie,S.G. Determining the Antimicrobial Actions of Tea Tree Oil. *Molecules.* 2001.
- 22.**Charles L, Attama AA. Current state of nanoemulsions in drug delivery. *J. Biomat. Nanobiotech.* 2: 626-639.2011
- 23.**Chime S.A; F.C. Kenechukwu.; A.A. Attama. Nanoemulsions — Advances in Formulation, Characterization and Applications in Drug Delivery. 2014.
- 24.**Chinnannan Karthik, Namasivayam Elangovan, Thamilarasan Senthil Kumar, Subramani Govindharaju, Selvaraj Barathi, Mohammad Oves, Padikasan Indra Arulselvi, Characterization of multifarious plant growth promoting traits of rhizobacterial strain AR6 under Chromium (VI) stress, *Microbiological Research*, Volume 204, Pages 65-71, 2017.

- 25.**Daltin, D. Emulsionantes: química, propriedades e aplicações. São Paulo: Blucher.2012.
- 26.**Dennerstein GJ, Ellis DH. Oestrogen, glycogen and vaginal candidiasis. Aust N Z J Obstet Gynaecol. 2001.
- 27.**Dunne, M.; Bibby, D.C.; Jones, J.C.; Cudmore, S. Encapsulation of protamine sulphate compacted DNA in polylactide and polylactide-co-glycolide microparticles. *J. Control. Release*, Amsterdam, v.92, p.209-219, 2003.
- 28.**Ferreira, S.H, Rangel, M.C. Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 7, 1860-1870, 2009.
- 29.**Galan, D.M.; Ezeudu, N.E.; Garcia, J.; Geronimo, C.A.; Berry, N.M.; Malcolm, B.J. Eucalyptol (1,8-Cineole): An Underutilized Ally in Respiratory Disorders? *J. Essent. Oil Res.* 2020.
- 30.**Gershenson, J.; Külheim, C.; Foley, W.J. Four Terpene Synthases Contribute to the Generation of Chemotypes in Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*). *BMC Plant Biol.* 2017.
- 31.**Gołąbek K, Strzelczyk JK, Owczarek A, CuberP,Ślemp-Migiel A,Wiczkowski A. Selected mechanisms of molecular resistance of *Candida albicans* to azole drugs. *Acta Biochim Pol.* 2015
- 32.**Gómez-Garibay F, Reyes Chilpa R, Quijano L, Calderón Pardo JS, Ríos Castillo T. Methoxy furan auranols with fungistatic activity from *Lonchocarpus castilloi*. *Phytochemistry.* 29(2):459-63.1990.
- 33.**Gonçalves, B., Ferreira, C., Alves, C. T., Henriques, M., Azeredo, J., Silva, S. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors. *Crit Rev Microbiol*, 42(6): 905–927.2016
- 34.**Gostynska, A.; Czerniel, J.; Ku ´zmi ´nska, J.; Brzozowski, J.; Majchrzak-Celi ´nska, A.; Krajka-Ku ´zniak, V.; Stawny, M. Honokiol-Loaded Nanoemulsion for Glioblastoma Treatment: Statistical Optimization, Physicochemical Characterization, and an In Vitro Toxicity Assay. *Pharmaceutics* 2023.
- 35.**Gursoy RN, Benita S. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomed Pharmacother* 58:173-182.2004.
- 36.**Graves S, Meleson K, Wilking J, Lin MY, Mason TG. Structure of concentrated nanoemulsions. *J Chem Phys.*122:134703. 2005
- 37.**Hammer, K.A.; Carson, C.F.; Riley, T.V., In vitro activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against dermatophytes and other filamentous fungi. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 50:195-199. 2002.

- 38.** Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V., Antifungal activity of the oil components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) - Journal of Applied Microbiology. 95, 853–860. 2003
- 39.** Hammer, K.A.; Carson, C.F.; Riley, T.V., Effects of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Essential Oil and the Major Monoterpene Component Terpinen-4-ol on the Development of Single- and Multistep Antibiotic Resistance and Antimicrobial Susceptibility - Antimicrobial Agents and Chemotherapy. V.56:2 p.909-915.2012.
- 40.** Hart, P.H.; Brand, C.; Carson, C.F.; Riley, T.V.; Prager, R.H.; Finlay-Jones, J.J. Terpinen-4-Ol, the Main Component of the Essential Oil of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree Oil), Suppresses Inflammatory Mediator Production by Activated Human Monocytes. Inflamm. Res. 2000.
- 41.** Homer LE, Leach DN, Lea D, Lee LS, Henry RJ, Baverstock PR Natural variation in the essential oil content of *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae). Biochem Syst Ecol 28:367–382. 2000
- 42.** Hunter, R. J. Zeta Potential in Colloid Science: Principles and Applications. Academic Press.1981
- 43.** Hussain A, A. Samad, S.K. Singh, M.N. Ahsan, M.W. Haque, A. Faruk, F.J. Ahmed, Nanoemulsion gel-based topical delivery of an antifungal drug: in vitro activity and in vivo evaluation, Drug Deliv. 23, 2016.
- 44.** Jain, S., Thakur, N., & Hassan, M. I. Essential oil and garlic compound inhibits the growth of *S. aureus* and *Candida albicans*. International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology, 8(3), 57-62. 2017.
- 45.** J D Desai, I M Banat. Microbial production of surfactants and their commercial potential. 1997
- 46.** Kauffman CA. Candidíase. In: Goldman, L.; Ausiello, D. Cecil: Tratado de Medicina Interna. 22. ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2005.
- 47.** Kashem, S. W., Igyártó, B. Z., Gerami-Nejad, M., Kumamoto, Y., Mohammed, J., Jarrett, E., Drummond, R. A., Zurawski, S. M., Zurawski, G., Berman, J. *Candida albicans* morphology and dendritic cell subsets determine T helper cell differentiation. Immunity 42, 356-366.2015.
- 48.** Kelen F. D. Dota, Alessandra R. Freitas, Marcia E. L. Consolaro, Terezinha I. E. Svidzinski, A Challenge for Clinical Laboratories: Detection of Antifungal Resistance in *Candida* Species Causing Vulvovaginal Candidiasis, *Laboratory Medicine*, Volume 42, Issue 2, February 2011.
- 49.** Komaiko, J. S., and D. J. McClements. Formation of food-grade nanoemulsions using low-energy preparation methods: A review of available

methods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 15 (2):331-52. 2016

50.Köhler JR, Casadevall A, Perfect J. The spectrum of fungi that infects humans. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014.

51.Kumar, M., RS Bishnoi, AK Shukla e CP Jain. Técnicas para formulação de sistema de liberação de fármacos em nanoemulsão: uma revisão. *Nutrição Preventiva e Ciência dos Alimentos.* 2019

52.Khani S, F. Keyhanfar, A. Amani, Design and evaluation of oral nanoemulsion drug delivery system of mebudipine, *Drug Deliv.* 23. 2016.

53.Lala RR, N.G. Awari, Nanoemulsion-based gel formulations of COX-2 inhibitors for enhanced efficacy in inflammatory conditions, *Appl. Nanosci.* 4. 2014.

54.Langevin, P. "On the Theory of Brownian Motion." *Acad Paris* 146, 530-533.1908

55.Legrand, p.; barratt, g.; mosqueira, v.; fessi, h.; devissaguet, j-p. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems: a review. *S.T.P. Pharma Sci.*, Paris v.9, p.411-418, 1999.

56.Leila Sekhavat, Afsarosadat Tabatabaie, Fatemah Zare Tezerjani, Oral fluconazole 150mg single dose versus intra-vaginal clotrimazole treatment of acute vulvovaginal candidiasis, *Journal of Infection and Public Health*, Volume 4, Issue 4, 2011

57.Li, G.-X.; Liu, Z.-Q. Unusual Antioxidant Behavior of α - and β -Terpinene in Protecting Methyl Linoleate, DNA, and Erythrocyte. *J. Agric. Food Chem.* 2009.

58.LORENZI, Harri; MATOS, Francisco J.A. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.* Nova Odesa: Instituto Plantarum, 2002.

59.Loughlin, R.; Gilmore, B.F.; McCarron, P.A.; Tunney, M.M. Comparison of the Cidal Activity of Tea Tree Oil and Terpinen-4-Ol against Clinical Bacterial Skin Isolates and Human Fibroblast Cells. *Lett. Appl. Microbiol.* 2008.

60.Lyklema, J. *Fundamentals of Interface and Colloid Science.* Academic Press.1995

61.Makidon PE, S.S. Nigavekar, A.U. Bielinska, N. Mank, A.M. Shetty, J. Suman, J.Knowlton, A. Myc, T. Rook, J.R. Baker Jr., Characterization of stability and nasal delivery systems for immunization with nanoemulsion-based vaccines, *J. Aerosol. Med. Pulm. Drug. Deliv.* 23. 2010.

62.Malvern Panalytical. *Zetasizer Nano Series User Manual.*2004.

63.Malvern Panalytical. "Introduction to Particle Size Analysis."2018.

- 64.**Mason TG, J.Wilking, K. Meleson, C. Chang, S. Graves, Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties, *J. Phys. Condens. Matter* 18. 2006
- 65.**Martel CM., Parker JE., Bader O, Weig M, Gross U. et al. Identification and characterization of four azole-resistant *erg3* mutants of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010.
- 66.**Mahdi Jafari S, He Y, Bhandari B. Nano-emulsion production by sonication and microfluidization—a comparison. *Int J Food Prop.* 2006.
- 67.**Manohar, V., Ingram, C., Gray, J., Talpur, N. A., Echard, B. W., Bagchi, D & Preuss, H. G. Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 228(1-2), 111-117. 2001.
- 68.**Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2), 119-128. 2013
- 69.**Menezes, A. P. S., Brião, D., Artico, L. L., & Lima, L. F. P. Utilização De Plantas Medicinais Em Um Município Inserido No Bioma Pampa Brasileiro. *Revista Da Universidade Vale Do Rio Verde*, 14(2), 206–219.2016
- 70.**Mou, H. Chen, D. Du, C. Mao, J. Wan, H. Xu, X. Yang, Hydrogel-thickened nanoemulsion system for topical delivery of lipophilic drugs, *Int. J. Pharm.* 353. 2008
- 71.**Monod, M., & Borg-Von Zepelin, M. Secreted aspartic proteases as virulence factors of *Candida* species. *Biological Chemistry*, 383(7-8), 1087-1093.2002
- 72.**Naglik JR, Moyes DL, Wächtler B, Hube B. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. *Microbes Infect* 13:963–976.2011
- 73.**Naglik JR (2014) *Candida* Immunity. *New J Sci* .10.1155/2014/390241 Review. 2014
- 74.**Nasr M, S. Nawaz, A. Elhissi, Amphotericin B lipid nanoemulsion aerosols for targeting peripheral respiratory airways via nebulization, *Int. J. Pharm.* 436. 2012.
- 75.**Nelson Siukei Lam, Xinxin Long, Xin-zhuan Su, Fangli Lu, Melaleuca alternifolia (tea tree) oil and its monoterpene constituents in treating protozoan and helminthic infections, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Volume 130.2020.
- 76.**Neto MM, Danesi CC, Unfer DT. Candidíase bucal: Revisão de literatura. *Revista de Saúde (Santa Maria)*, Santa Maria. 2005.
- 77.**Nitschke, M., & Pastore, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. *Química Nova*, 25(5), 772–776. 2002.
- 78.** Nurbhai M, Grimshaw J, Watson M, Bond CM, Mollison J Ludbrook A. Oral versus intra- vaginal imidazole and triazole anti-fungal treatment of

uncomplicated vulvovaginal candidiasis (thrush). Cochrane Database Syst Rev. 2007

79.Novacosk, R.; Torres, R.S.L.A. Atividade antimicrobiana sinérgica entre óleos essenciais de lavanda (*Lavandula officinalis*), MELALEUCA (*Melaleuca alternifolia*), CEDRO (*Juniperus virginiana*), TOMILHO (*Thymus vulgaris*) E CRAVO (*Eugenia caryophyllata*) - Revista Analytica N°21: p. 36-39, fevereiro/março 2006.

80.Ottewill, R. H. The Widths of Particle Size Distributions. Transactions of the Faraday Society, 59, 1200-1207.1963

81.Onishi, J., Meinz, M., Thompson, J., Curotto, J., Dreikorn, S., Rosenbach, M., Douglas, C., Abruzzo, G., Flattery, A., Kong, L., Cabello, A., Vicente, F., Pelaez, F., Diez, M. T., Martin, I., Bills, G., Giacobbe, R., Dombrowski, A., Schwartz, R., Morris, S., Harris, G., Tsiouras, A., Wilson, K., & Kurtz, M. B.2000

82.Parma, M., Stella, V, & Latreille, P. Probiotics in the Prevention of Recurrent Vulvovaginal Candidiasis: A Review. Fungal Genomics & Biology, 8(1).2018.

83.Paul L. Fidel Melissa Barousse Terri Espinosa Mercedes Ficarra Joy Sturtevant David H. Martin Alison J. Quayle Kathleen Dunlap An Intravaginal Live Candida Challenge in Humans Leads to New Hypotheses for the Immunopathogenesis of Vulvovaginal Candidiasis 2004

84.Pate, K. & Safier, P. Chemical metrology methods for CMP quality. 2016

85.Pawar VK, S.B. Panchal, Y. Singh, J.G. Meher, K. Sharma, P. Singh, H.K. Bora, A. Singh, D. Datta, M.K. Chourasia, Immunotherapeutic vitamin E nanoemulsion synergies the antiproliferative activity of paclitaxel in breast cancer cells via modulating Th1 and Th2 immune response, J. Control. Release 196 2014.

86.Prasad, R., Shah, A. H., & Rawal, M. K. Antifungals: mechanism of action and drug resistance. Yeast Membrane Transport, p. 327-349. 2016

87.Polke, M., Hube, B., & Jacobsen, I. D. Candida survival strategies. Advances in Applied Microbiology, 91, 139-235.2015

88.Poulain, D. Candida albicans, plasticity and pathogenesis. Critical Reviews in Microbiology, 41(2), 208-217. 2015

89.Pimentel, L. F., Jácome Júnior, A. T., Mosqueira, V. C. F., & Santos-Magalhães, N. S. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. Revista Brasileira De Ciências Farmacêuticas, 43(4), 503–514.2007

90.Qian C, McClements DJ. Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: factors affecting particle size. Food Hydrocoll. 2011

- 91.**Rabinovich-Guilatt, L., Couvreur, P., Lambert, G., Goldstein, D., Benita, S., & Dubernet, C. Extensive surface studies help to analyse zeta potential data: the case of cationic emulsions. *Chemistry and Physics of Lipids*, 131(1), 1-13. 2004
- 92.**Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., & Moore, P. K. *Farmacologia*. (6a ed.), Guabanara. 2007
- 93.**Ren B, Dai HQ, Pei G, Tong YJ, Zhuo Y, Yang N, Su MY, Huang P, Yang YZ, Zhang LX.ABC transporters coupled with the elevated ergosterol contents contribute to the azole resistance and amphotericin B susceptibility. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014.
- 94.**Richwagen, N., Lyles, J. T., Dale, B. L. F., & Quave, C. L. (2019). Antibacterial Activity of *Kalanchoe mortagei* and *K. Fedtschenkoi* Against ESKAPE Pathogens. *Frontiers in Pharmacology*, 10(FEB), 1–13. 2019
- 95.**Roco, M. C.; *J. Nanoparticle Res*. 2001.
- 96.**Rosen, M. J. *Surfactants and Interfacial Phenomena* (3rd ed.). John Wiley & Sons.2004
- 97.**Rutvij JP, Gunjan JP, Bharadia PD, Pandya VM, Modi DA. Nanoemulsion: Na advanced concept of dosage form. *Int. J. Pharm. Cosmetol*. 1(5): 122-133.2011.
- 98.**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. *Radiat. Phys. Chem.*, Amsterdam, v.76, p.733-737, 2007.
- 99.**Sanglard, D., & Odds, F. C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *The Lancet Infectious Diseases*, 2(2), 73-85.2002.
- 100.**Santos, n.p.; nascimento, s.c.a.; silva, j.f.; pereira, e.c.g.; silva, n.h.; honda, n.k.; santos-magalhães, n.s. Usnic acid-loaded nanocapsules: an evaluation of cytotoxicity. *J. Drug Del. Sci. Tech.*, Paris, v.15, p.355-361, 2005.
- 101.**Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D. W., & Azeredo, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS microbiology reviews*, 36(2), 288-305.2012.
- 102.**Sobel JD, Chain W. Treatment of *Torulopsis glabrata* vaginitis: a retrospective review of boric acid therapy. *Clin Infect Dis*.1997
- 103.**Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. *Lancet*. 2007;369(9577):1961-1971.
- 104.**Sobel JD, Chain W. Treatment of *Torulopsis glabrata* vaginitis: a retrospective review of boric acid therapy. *Clin Infect Dis*.24(4):649-52.1997

- 105.**Solans C, Solé I. Nano-emulsions: formation by low-energy methods. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2012
- 106.**Shaban, S.M.; Aiad, I.; El-Sukkary, M.M.; Soliman, E.A.; El-Awady, M.Y. Surface and biological activity of N-(((dimethoxybenzylidene)amino) propyl)-N,Ndimethylalkyl-1-ammonium derivatives as cationic surfactants. *Journal of Molecular Liquids*, v.207, p.256–265, 2015.
- 107.**Sharma N, S. Mishra, S. Sharma, R.D. Deshpande, R.K. Sharma, Preparation and optimization of nanoemulsions for targeting drug delivery, *Int. J. Drug Dev. Res.* 5 (4). 2013
- 108.**Shapira, S.; Pleban, S.; Kazanov, D.; Tirosh, P.; Arber, N. Terpinen-4-Ol: A Novel and Promising Therapeutic Agent for Human Gastrointestinal Cancers. *PLoS ONE* 2016
- 109.**Shemesh, A., and W. L. Mayo. Australian tea tree oil: a natural antiseptic and fungicidal agent. *Aust. J. Pharm.* 72:802–803.1991.
- 110.**Shoham S, Levitz SM. The immune response to fungal infections. *Br J Haematol* 129:569–582. 2005.
- 111.**Tamarkin D, A. Besonov, M. Eini, J. Danziger, Foam prepared from nanoemulsions and uses, in *Google Patents*, 2007.
- 112.**Tan SL, J. Stanslas, M. Basri, R.A. Abedi Karjiban, B.P. Kirby, D. Sani, H.B. Basri, Nanoemulsion-based parenteral drug delivery system of carbamazepine: preparation, characterization, stability evaluation and blood-brain pharmacokinetics, *Curr. Drug Deliv.* 2015
- 113.**Tao, s.l.; desai, t.a. Microfabricated drug delivery systems: from particles to pores. *Adv. Drug Del. Rev.*, Arlington, v.55, p.315-328, 2003.
- 114.**Taylor DL, Hollingsworth TN, McFarland JW, Lennon NJ, Nusbaum C, Ruess RW A first comprehensive census of fungi in soil reveals both hyperdiversity and fine-scale niche partitioning. *Ecol Monogr* 84:3–20. 10.1890/12-1693.2014
- 115.**Thompson, D. S., Carlisle, P. L., & Kadosh, D. (2011). Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryotic cell*, 10(9), 1173-1182.
- 116.**Turner, S.A., Butler, G. The *Candida* pathogenic species complex. *Cold Spring Harb Perspect Med.*2014
- 117.**Vale-Silva LA, Coste AT, Ischer F, Parker JE, Kelly SL, Pinto E, Sanglard D. Azole resistance by loss of function of the sterol $\Delta^{5,6}$ -desaturase gene (*ERG3*) in *Candida albicans* does not necessarily decrease virulence. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012

- 118.**Verma, r.k.; garg, s. Current status of drug delivery technologies and future directions. *Pharmac. Technol.*, v.25, n.2, p.1-4, 2001.
- 119.**Xie HY, Feng D, Wei DM, et al. Probiotics for vulvovaginal candidiasis in non-pregnant women. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017.
- 120.**Yashpal S, Tanuj H, Harsh K. Nanoemulsions: A pharmaceutical review. *Int. J. Pharma. Prof. Res.* 4(2): 928-935.2013
- 121.**Yasin, M.; Younis, A.; Javed, T.; Akram, A.; Ahsan, M.; Shabbir, R.; Ali, M.M.; Tahir, A.; El- Ballat, E.M.; Sheteiwy, M.S.; et al. River Tea Tree Oil: Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities, and Potential Applications in Agriculture. *Plants* 2021.
- 122.**Yukuyama MN, D.D.M. Ghisleni, T.J.A. Pinto, N.A. Bou-Chacra, Nanoemulsion: process selection and application in cosmetics – a review, *Int. J. Cosmet. Sci.* 38. 2016
- 123.**Wang L, X. Li, G. Zhang, J. Dong, J. Eastoe, Oil-in-water nanoemulsions for pesticide formulations, *J. Colloid Interface Sci.* 314. 2007
- 124.**Whaley, S. G., Berkow, E. L., Rybak, J. M., Nishimoto, A. T., Barker, K. S., Rogers, P. D. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-albicans *Candida* species. *Front. Microbiol.* 7, 2173.2017