



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PRÓ- REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

CAMILA FONSECA BEZERRA

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE SESQUITERPENOS LIVRES E EM
FORMULAÇÃO LIPOSSÔMICA FRENTE A *Candida spp.***

Recife

2021

CAMILA FONSECA BEZERRA

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE SESQUITERPENOS LIVRES E EM
FORMULAÇÃO LIPOSSÔMICA FRENTE A *Candida* spp.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco- UFPE, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e medicamentos

Linha de pesquisa: Obtenção e avaliação de produtos naturais e compostos bioativos

Orientadora: Prof^a. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva

Coorientadora: Prof^a Dra. Maria Flaviana Bezerra Moraes Braga

Recife

2021

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

B574p Bezerra, Camila Fonseca.
Potencial antifúngico de sesquiterpenos livres e em formulação lipossômica frente a *Candida* spp / Camila Fonseca Bezerra. – 2021.
88 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Teresinha Gonçalves da Silva.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2021.
Inclui referências e apêndices.

1. Nanotecnologia. 2. Candida. 3. Fluconazol. 4. Anti-pleomorfismo. 5. Lipossomas. I. Silva, Teresinha Gonçalves da (Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (20. ed.) UFPE (CCS 2021-130)

CAMILA FONSECA BEZERRA

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE SESQUITERPENOS LIVRES E EM
FORMULAÇÃO LIPOSSÔMICA FRENTE A *Candida spp.***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco- UFPE, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e medicamentos

Aprovada em: 04 / 05 / 2021

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim
(Presidente da Banca- UFPE)

Prof^ª. Dra. Maria Bernadete de Sousa Maia
(Avaliadora Interna- UFPE)

Prof^º. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho
(Avaliador Externo- URCA)

Prof^ª. Dra. Jacqueline Cosmo Andrade Pinheiro
(Avaliadora Externa- UFCA)

Prof^ª Dr. José Geraldo de Alencar Santos Júnior
(Avaliador Externo- URCA)

Dedico esse trabalho a minha família, em especial, aos meus pais e aos meus filhos,
alegria de minha vida e minha força para viver e lutar!

AGRADECIMENTOS

Ao meu amado **Deus**, meu melhor amigo e meu protetor, por sempre guiar meus caminhos, por me dar perseverança em tudo e iluminado minha jornada para chegar até aqui.

Aos meus pais, **Maria Dinalmi Fonseca M. Bezerra e Francisco Bezerra de Almeida**, pelo grande amor e paciência dedicados a mim e ao meu filho Heitor, com muito zelo e carinho, estímulo, ensinamentos e dedicação em todas as etapas da minha vida.

Aos meus filhos, **Heitor Hmõpre Fonseca e ao Otto Adler Fonseca**, por ser meu estímulo para lutar pelos meus sonhos e fazer de tudo para dar o melhor a vocês.

Ao meu estimado, **Thiago Adler Tavares Vieira**, por toda paciência, amor e companheirismo em todos os momentos que precisei, muitas vezes me ajudando no laboratório nos experimentos, nas escritas e nos conselhos.

Aos meus grandes amigos **Felicidade Caroline, Gleice Melo e Weverton Bezerra**, os quais me abrigaram em Recife e me acolheram com tanto amor e carinho, para sempre em meu coração.

Ao professor e amigo, **Profº. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho**, que também considero como um segundo pai, por todo apoio prestado, toda humildade, ajuda diária, paciência e ensinamentos.

A minha querida orientadora **Profª. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva** por toda receptividade, com muita disposição e paciência para propagar seus conhecimentos e seus alunos do BIOFARMATOX pela parceria e amizade.

A minha Coorientadora e amiga, **Profª. Dra. Maria Flaviana Bezerra Moraes Braga**, por sempre cuidar de seus orientandos com tanto amor e zelo, por toda paciência, confiança em meu trabalho e pelas orientações para o enriquecimento deste trabalho.

Aos meus amigos do Laboratório de Micologia Aplicada do Cariri- LMAC e do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular- LMBM, em especial ao **Prof. José Geraldo de Alencar, Rosilaine Lima, Thassya Lucas, Carolaine Pereira, Taís Gusmão, Thiago Sampaio**, por toda disposição, dedicação e zelo em todos os experimentos que me ajudaram e em tudo que precisei.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas- PPGCF e a todos os seus professores, pela oportunidade de realização do doutorado e pelos ensinamentos transmitidos. A secretaria do PPGCF **Nerilin Trajano e Rilvan** pelos auxílios e paciência prestados no decorrer do curso.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio às pesquisas. A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização e sucesso deste trabalho. Muito obrigada a todos.

RESUMO

As patologias fúngicas causadas pelo gênero *Candida* tem aumentado sua incidência nos últimos anos devido ao acometimento de pessoas imunossuprimidas e ao avanço dos mecanismos de resistência. O avanço da nanotecnologia em busca de novas estratégias para melhora da distribuição, estabilidade dos fármacos, bem como a especificidade pelo alvo, devido à compatibilidade com a membrana, objetivando reduzir a toxicidade celular e aumentar a qualidade dos compostos testados. Os lipossomas são nanovesículas com bicamadas lipídicas que armazenam compostos em seu interior ou adsorvidos na superfície. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar potencial antifúngico dos sesquiterpenos α -bisabolol, nerolidol, farnesol e trans-cariofileno isolados e na forma lipossomal, além da associação com o fluconazol. Os lipossomas foram preparados a partir de colesterol, fosfatidilserina e fosfatidilcolina e caracterizados fisicamente de acordo com o tamanho vesicular, índice de polidispersão, potencial Zeta Médio e microscopia eletrônica de varredura. Os ensaios antifúngicos foram realizados frente a cepas padrões de *Candida albicans* (CA), *Candida tropicalis* (CT), e *Candida krusei* (CK), por microdiluição para identificação da CI50 e obtenção curva de viabilidade celular. A Concentração Fungicida Mínima foi realizada por subcultivo em meio sólido. A concentração subinibitória dos compostos foi associada ao fluconazol para verificar o efeito inibidor fúngico e potencializador. Testes para avaliar a interferência na transição morfológica foram realizados em câmaras de microcultivos nas concentrações 1024 e 2048 $\mu\text{g/mL}$. Os lipossomas apresentaram-se polidispersos, com vesículas de diâmetros de 185,46 nm para o controle e variaram de 132,3 a 418,9 nm para os compostos conjugados com sesquiterpenos. Verificou-se formatos esféricos das vesículas. Os valores correspondentes a CI50 das substâncias variaram de 2,5 a 47.566,67 $\mu\text{g/mL}$, o menor valor foi entre as associações: α -bisabolol, nerolidol e farnesol lipossomal conjugados ao fluconazol frente a CA e CT, reduzindo sua concentração e inibindo totalmente o crescimento fúngico, revelando uma potencialização do fármaco. Em relação a inibição da virulência fúngica, o pleomorfismo, o farnesol, trans-cariofileno e α -bisabolol isolado e lipossomal inibiram 100% da virulência fúngica em CA, em relação à CT o farnesol isolado inibiu totalmente a formação de estruturas filamentosas na maior concentração avaliada e em CK a inibição não foi significativa. O α -bisabolol e o trans-cariofileno isolado não apresentaram um efeito inibitório significativo frente a CT, no entanto frente a cepa CK na maior concentração inibiu 100% no crescimento filamentoso em ambas as concentrações. O nerolidol livre e lipossomal não apresentaram potencial de inibição

filamentosa em nenhuma das concentrações nas cepas testadas. Este é o primeiro registro da atividade antifúngica desses sesquiterpenos em sistema lipossomal com sua atuação isolada e em associação ao antifúngico fluconazol. Diante disso, nossos resultados demonstraram o efeito promissor a partir da potencialização do fluconazol pelos sesquiterpenos, frente às espécies CA e CT, efeito antidimórfico, com destaque para o farnesol, α -bisabolol e trans-cariofileno. Além disso, os resultados obtidos mostram um espectro de atividades antifúngicas e fornecem evidências científicas para o uso desses sesquiterpenos como antifúngicos.

Palavras-chave: Nanotecnologia. *Candida*. Fluconazol. Anti- pleomorfismo. Lipossomas.

ABSTRACT

Fungal pathologies caused by the genus *Candida* have increased their incidence in recent years due to the involvement of immunosuppressed people and the advance of resistance mechanisms. The advancement of nanotechnology in search of new strategies to improve distribution, drug stability, as well as target specificity, due to compatibility with the membrane, aiming to reduce cell toxicity and increase the quality of the tested compounds. Liposomes are nanovesicles with lipid bilayers that store compounds inside or adsorbed on the surface. Therefore, the aim of this work was to evaluate the antifungal potential of the sesquiterpenes α -bisabolol, nerolidol, farnesol and trans-karyophyllene isolated and in liposomal form, in addition to the association with fluconazole. The liposomes were prepared from cholesterol, phosphatidylserine and phosphatidylcholine and were physically characterized according to the vesicular size, polydispersity index, Zeta Medium potential and scanning electron microscopy. Antifungal tests were performed against standard strains of *Candida albicans* (CA), *Candida tropicalis* (CT), and *Candida krusei* (CK), by microdilution to identify the IC₅₀ and obtain a cell viability curve. The Minimal Fungicide Concentration was performed by subculture in solid medium. The subinhibitory concentration of the compounds was associated with fluconazole to verify the fungal inhibitory and potentiating effect. Tests to assess the interference in the morphological transition were carried out in microculture chambers at concentrations 1024 and 2048 $\mu\text{g} / \text{mL}$. The liposomes were polydispersed, with vesicles with diameters of 185.46 nm for the control and varied from 132.3 to 418.9 nm for compounds conjugated with sesquiterpenes. Spherical shapes of the vesicles were found. The IC₅₀ values of the substances ranged from 2.5 to 47,566.67 $\mu\text{g} / \text{mL}$, the lowest value was between the associations: α -bisabolol, nerolidol and liposomal farnesol conjugated to fluconazole against CA and CT, reducing its concentration and inhibiting fully fungal growth, revealing a potentiation of the drug. Regarding the inhibition of fungal virulence, pleomorphism, farnesol, trans-karyophyllene and isolated α -bisabolol and liposomal inhibited 100% of fungal virulence in CA, in relation to CT, isolated farnesol totally inhibited the formation of filamentous structures in the highest concentration evaluated and in CK the inhibition was not significant. The α -bisabolol and the trans-karyophyllene alone did not have a significant inhibitory effect against CT, however, against the CK strain in the highest concentration, it inhibited 100% in the filamentous growth in both concentrations. Free and liposomal nerolidol showed no potential for filamentary inhibition at any of the concentrations in the strains tested. This is the first record of the antifungal activity of these

sesquiterpenes in the liposomal system with their isolated action and in association with the antifungal fluconazole. Therefore, our results demonstrated the promising effect from the potentiation of fluconazole by sesquiterpenes, against the species CA and CT, antidimorphic effect, with emphasis on farnesol, α -bisabolol and transcariophyllene. In addition, the results obtained show a spectrum of antifungal activities and provide scientific evidence for the use of these sesquiterpenes as antifungals.

Keywords: Nanotechnology. *Candida*. Fluconazole. Anti-pleomorphism. Liposomes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação dos tipos de lipossomas	22
Figura 2 – Fórmula estrutural do α - bisabolol	26
Figura 3 – Fórmula estrutural do farnesol	27
Figura 4 – Fórmula estrutural do nerolidol	29
Figura 5 – Fórmula estrutural do trans- cariofileno	30
Figura 6 – Patogênese da invasão tecidual e sanguínea por <i>Candida</i> spp.	32
Figura 7 – Exemplos de imagens por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e o gráfico do tamanho vesicular por concentração de partículas/ mL.	43
Figura 8 – Curva de viabilidade celular de <i>Candida</i> spp. sob ação do α -bisabolol livre, na forma lipossomal, lipossomas (controle) e fluconazol (controle).	46
Figura 9 – Curva de viabilidade celular de <i>Candida</i> spp. sob ação do farnesol livre, na forma lipossomal, lipossomas (controle) e fluconazol (controle).	47
Figura 10 – Curva de viabilidade celular de <i>Candida</i> spp. sob ação do nerolidol livre, na forma lipossomal, lipossomas (controle) e fluconazol (controle).	48
Figura 11 – Curva de viabilidade celular de <i>Candida</i> spp. sob ação do trans-cariofileno livre, na forma lipossomal, lipossomas (controle) e fluconazol (controle).	48
Figura 12 – Ilustração do efeito dos compostos nas colônias fúngicas.	49
Figura 13 – Curva de viabilidade celular de <i>Candida</i> spp. sob ação do α -bisabolol livre, na forma lipossomal, lipossomas (controle) associados ao Fluconazol.	50
Figura 14 – Curva de viabilidade celular de <i>Candida</i> spp. sob ação do farnesol livre, na forma lipossomal, lipossomas (controle) e fluconazol (controle) associados ao Fluconazol.	51
Figura 15 – Curva de viabilidade celular de <i>Candida</i> spp. sob ação do nerolidol livre, na forma lipossomal, lipossomas (controle) e fluconazol (controle) associados ao Fluconazol.	52

- Figura 16** – Curva de viabilidade celular de *Candida* spp. sob ação do trans- cariofileno livre, na forma lipossomal, lipossomas (controle) e fluconazol (controle) associados ao Fluconazol. 53
- Figura 17** – Efeito no dimorfismo fúngico do α -bisabolol livre, na forma lipossomal, lipossomas (controle) e fluconazol (controle) frente a linhagens de *Candida*. 54
- Figura 18** – Efeito no dimorfismo fúngico do farnesol livre, na forma lipossomal, lipossomas (controle) e fluconazol (controle) frente a linhagens de *Candida*. 55
- Figura 19** – Efeito no dimorfismo fúngico do nerolidol livre, na forma lipossomal, lipossomas (controle) e fluconazol (controle) frente a linhagens de *Candida*. 56
- Figura 20** – Efeito no dimorfismo fúngico do trans- cariofileno livre, na forma lipossomal, lipossomas (controle) e fluconazol (controle) frente a linhagens de *Candida* 57
- Figura 21** – Imagens de microscopia óptica demonstrando os efeitos das diferentes concentrações atuando no dimorfismo fúngico. 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas dos sesquiterpenos utilizados no estudo	25
Tabela 2 – Fármacos antifúngicos e seus alvos celulares	36
Tabela 3 – Caracterização dos lipossomas: tamanho vesicular, quociente de dispersividade e potencial zeta.	42
Tabela 4 – CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) dos sesquiterpenos nas formas livre, lipossomal e controles isolado e associados ao fluconazol frente à linhagens de <i>Candida</i> .	44

LISTA DE SÍMBOLOS

®	Marca registrada
µm	Micrômetro
g	Grama(s)
mg/g	Miligramas por grama
mg/mL	Miligramas de soluto por mililitro de solvente
mL	Mililitro (s)
mm	Milímetro (s)
mV-	miliVolt
NaCl	Cloreto de Sódio
Nm	Nanômetro
°C	Grau Celsius
µg/mL	Microgramas de soluto por mililitro de solvente
µL	Microlitro (s)

LISTA DE SIGLAS

BSD	<i>Broth Sabouraud Dextrose</i>
CA	<i>Candida albicans</i>
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CI ₅₀	Concentração de Inibição de 50%
CK	<i>Candida krusei</i>
CM	Concentração Matriz
CSD	Caldo Saboraud Dextrose
CT	<i>Candida tropicalis</i>
DAS	<i>Sabouraud Dextrose Agar</i>
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DOTAP	1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
DPPS	Dipalmitoilfosfatidilserina
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IP	Índice de Polidispersão
LUV	Vesículas Unilamelares Grandes
MLV	Vesículas Multilamelares
MPS	Sistema Fagocitário Mononuclear
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i>
PEG	Polietileno glicol
QS	<i>Quorum Sensing</i>
SUV	Vesículas Unilamelares Pequenas
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	20
3	REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1	NANOTECNOLOGIA	21
3.1.1	Lipossomas	22
3.1.2	Tipos de Lipossomas	23
3.2	SESQUITERPENOS	25
3.2.1	α Bisabolol	26
3.2.2	Farnesol	27
3.2.3	Nerolidol	30
3.2.4	Trans Cariofileno	31
3.3	GÊNERO <i>Candida</i>	33
3.3.1	<i>Candida albicans</i>	34
3.3.2	<i>Candida tropicalis</i>	35
3.3.3	<i>Candida krusei</i>	36
3.4	TERAPIA ANTIFÚNGICA	37
3.4.1	Azólicos: Fluconazol	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1	PREPARAÇÃO DOS SISTEMAS NANOESTRUTURADOS	38
4.2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADOS: ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO, POTENCIAL ZETA MÉDIO, TAMANHO VESICULAR E MORFOLOGIA.	39
4.3	ENSAIOS ANTIFÚNGICO	39
4.3.1	Cepas e meios de cultura	39
4.3.2	Drogas, reagentes e preparação de soluções	39
4.3.3	Determinação da CI_{50} e obtenção da curva de viabilidade celular	39

4.3.4 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)	40
4.3.5 Avaliação do efeito modificador da ação do fluconazol	40
4.3.6 Efeito dos compostos na morfologia fúngica	40
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
5 RESULTADOS	42
5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADOS: TAMANHO VESICULAR, ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO E POTENCIAL ZETA MÉDIO	42
5.2 INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO E EFEITO MODIFICADOR DA AÇÃO DO FLUCONAZOL - CURVA DE VIABILIDADE CELULAR E IC ₅₀	44
5.3 ANÁLISE DA CURVA DE VIABILIDADE CELULAR DE <i>CANDIDA</i> SPP. SOB AÇÃO DOS SESQUITERPENOS	45
5.4 ANÁLISE DA CURVA DE VIABILIDADE CELULAR DO EFEITO MODIFICADOR DA AÇÃO DO FLUCONAZOL	49
5.5 EFEITO DOS COMPOSTOS NA MORFOLOGIA FÚNGICA	53
6 DISCUSSÃO	58
7 CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS	65
APÊNDICE A – ARTIGO 1- ANTIFUNGAL PROPERTIES OF NEROLIDOL-CONTAINING LIPOSOMES IN ASSOCIATION WITH FLUCONAZOLE	86
APÊNDICE B – ARTIGO 2- ANTIFUNGAL ACTIVITY OF FARNESOL INCORPORATED IN LIPOSOMES AND ASSOCIATED WITH FLUCONAZOLE.	87
APÊNDICE C – ARTIGO 3- ANTIFUNGAL EFFECT OF	88

**LIPOSOMAL *A*-BISABOLOL AND WHEN ASSOCIATED
WITH FLUCONAZOLE.**

1 INTRODUÇÃO

As afecções fúngicas oriundas de espécies do gênero *Candida* estão surgindo como um considerável problema no campo da saúde, atingindo altas taxas de mortalidade e custos médicos, tornando-se onerosos para governos e pacientes hospitalizados (NAMI *et al.*, 2019; MEDICI; POETA, 2015). Essas taxas de mortalidade podem estar relacionadas à ocorrência crescente de infecções sistêmicas invasivas e casos de septicemia, especialmente em pacientes imunocomprometidos (NAMI *et al.*, 2019; SAKAGAMI *et al.*, 2019).

Atualmente, as doenças sistêmicas por *Candida* (candidoses) são a quarta principal causa de infecções nosocomiais da corrente sanguínea (SAKAGAMI *et al.*, 2019; MARAK; DHANASHREE, 2018). De todas as infecções invasivas, 90% são causados por espécies oportunistas de *Candida* (NAMI *et al.*, 2019; SPAMINATO; LEONARDI, 2013). Algumas espécies são comensais em hospedeiros saudáveis, podendo tornar-se oportunistas onde estão incluídas as espécies: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei* (SPAMINATO; LEONARDI, 2013).

Nesse contexto, os fármacos antimicrobianos, empregados por um longo período, são usados para reduzir ou matar microrganismos. No entanto, a resistência microbiana a algumas dessas drogas se desenvolveu em larga escala ao longo do tempo, reduzindo bastante sua eficiência e se tornou um problema que se agrava a cada dia (HAJIPOUR *et al.*, 2012).

Compostos oriundos dos vegetais, especialmente óleos essenciais e seus constituintes, possuem alguns efeitos biológicos benéficos aos seres humanos, tais como atividades anti-microbiana, anti-inflamatória, anti-tumoral e analgésica. Os sesquiterpenos são substâncias aromáticas voláteis encontradas em muitas plantas. Podendo existir em frutas, sementes, flores e folhas. Eles são considerados como agentes antimicrobianos naturais mais populares e em pouco tempo ganhou popularidade e interesse científico, devido às suas propriedades (HE *et al.*, 2019).

Diante disso, uma das escolhas mais promissoras para superar a resistência microbiana é o uso da nanotecnologia (PELGRIFT; FRIEDMAN, 2013). Algumas substâncias antimicrobianas podem ser encapsuladas em nanoformulações, dessa forma podem reduzir o desenvolvimento de resistência microbiana (FRIEDMAN *et al.*, 2013). Além disso, a incorporação de vários compostos na mesma nanoestrutura pode corroborar em uma potencialização, maior eficácia antimicrobiana e possivelmente superar os mecanismos

existentes de resistência a medicamentos em micróbios em relação ao uso de cada medicamento isoladamente (ZHANG *et al.*, 2010; BLECHER; NASIR; FRIEDMAN, 2011; HUH; KWON, 2011).

As nanovesículas, como por exemplo, os lipossomas, são pequenos o suficiente para serem fagocitadas por células hospedeiras que contêm micróbios intracelulares. Uma vez dentro da célula hospedeira, essas nanopartículas podem liberar drogas que irão combater esses micróbios intracelulares (BLECHER; NASIR; FRIEDMAN, 2011; HUANG; CHEN, 2011; HUH; KWON, 2011; SHAH *et al.*, 2020; HAS; SUNTHAR, 2020).

Lipossomas são vesículas esféricas, formadas por um núcleo aquoso interno circundado por uma ou mais bicamada lipídica concêntrica, composta por moléculas de lipídeo anfifílico, como fosfolipídios. Possuem a vantagem de poder ser utilizado por via oral, são biodegradáveis, biocompatíveis e não tóxico. Os lipossomas também são reconhecidos como versáteis, podendo armazenar uma variedade de compostos de caráter hidrofílicos, lipofílicos e anfifílicos (ALMEIDA, 2009; RÓG *et al.*, 2009; BOUAOUD *et al.*, 2016; CROMMELIN; VAN HOOGEVEST; STORM, 2020).

Somando-se a esse fato, as nanopartículas podem dispensar altas concentrações de compostos antimicrobianas dentro das células hospedeiras infectadas, mantendo baixa a dose total do medicamento administrado (HUANG; CHEN, 2011).

Diante desses fatos, as combinações de fármacos ativos contra *C. albicans* podem se provar mais úteis como agentes terapêuticos do que compostos utilizados isoladamente. Portanto, algumas substâncias naturais são investigadas quanto ao sinergismo juntamente com azóis, polienos ou equinocandinas hoje usadas no tratamento da infecção por *Candida*. (HECTOR; BRAUN, 1986; KATRAGKOU *et al.*, 2015).

Advindos desse trabalho, foram publicados três artigos em periódicos internacionais. O primeiro *Antifungal Properties of Nerolidol-Containing Liposomes in Association with Fluconazole*, Periódico *Membranes*, MPDI. O segundo artigo publicado: *Antifungal activity of farnesol incorporated in liposomes and associated with fluconazole*, periódico *Chemistry and Physics of Lipids* ELSEVIER, Qualis CAPES B1 em Farmácia. E o terceiro *Antifungal Effect of Liposomal Bisabolol and when associated with Fluconazole*, periódico *Cosmetics* MPDI.

2 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Preparar, caracterizar formulações contendo sesquiterpenos em lipossomas e avaliar a atividade antifúngica frente a *Candida* ssp. dos nanoformulados sozinhos e em associação com o fluconazol.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a caracterização físico-química dos lipossomas produzidos, buscando avaliar a estabilidade das formulações;
- Determinar a CI_{50} dos sesquiterpenos livres, na forma conjugada e do Fluconazol;
- Identificar a Concentração Fungicida Mínima (CFM), dos compostos livres, na forma lipossomal e do fluconazol;
- Verificar se os compostos, em concentração sub-inibitória (Concentração Matriz- CM (CM/16)) exercem efeito potencializador sobre a ação do antifúngico (fluconazol) quando associados;
- Averiguar a ação dos sesquiterpenos (livres e lipossomais) e do fluconazol sobre o dimorfismo celular de leveduras de *Candida* e consequentemente seu efeito sobre um dos mecanismos de virulência do gênero;

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia é uma área de estudo multidisciplinar em desenvolvimento que tem como alvo a produção de estruturas em nanoescala com propriedades físicas e químicas passíveis de aplicações clínicas (ANDRONESCU; GRUMEZESCU, 2017).

A palavra "nano" vem do grego para "anão". Um nanômetro é um bilionésimo de metro (10^{-9} m), que equivale a cerca de 60.000 vezes menor que o diâmetro de um fio de cabelo humano ou do tamanho de um vírus. Uma folha de papel típica tem cerca de 100.000 nm de espessura, um eritrócito tem aproximadamente 2.000 a 5.000 nm de tamanho, e o diâmetro do DNA está na faixa de 2,5 nm. Portanto, a nanotecnologia lida com matérias que variam de metade do diâmetro do DNA até 1/20 do tamanho de um glóbulo vermelho (SEKHON, 2010).

A terminologia Nanotecnologia foi usada pela primeira vez em 1974, por Norio Taniguchi, para se referir à capacidade de projetar materiais precisamente na escala nano. Este é, de fato, o seu significado atual, “Materiais de Engenharia” é geralmente usado para compreender projeto, caracterização, produção e aplicação de materiais, e o escopo foi hoje em dia ampliado para incluir dispositivos e sistemas, em vez de apenas materiais. Nanotecnologia é assim definida como projeto e fabricação de materiais, dispositivos e sistemas com controle em dimensões nanométricas (RAMSDEN, 2005).

As aplicações da nanotecnologia cobrem grande parte dos domínios de aplicações industriais, melhorando o desempenho de produtos industrializados, podendo inserir novas propriedades na fabricação produtos (JUNG *et al.*, 2005; JOGENSEN *et al.*, 2009; WISSING; MULLER, 2003).

A nanociência vem sendo estudada devido à possibilidade da entrega específica de fármacos para o local de ação, com atividade direcionada reduzindo a possibilidade de efeitos colaterais, sendo possível a promoção de nanoformulações utilizadas como sistemas de liberação com controle, além de promover o aumento da penetração intracelular a partir de nanomateriais (AGRAWAL *et al.*, 2013).

O uso na medicina ocorre como terapêuticas nanomedicinais, incluindo sistemas de administração de medicamentos (OLIVIER, 2005), adjuvantes à radioterapia (GALPER *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2010) e como dispositivos médicos, incluindo agentes de contraste podendo serem utilizados em diagnóstico por imagiologia (CORMODE *et al.*, 2014; NEUWELT *et al.*, 2004; PERLMAN *et al.*, 2015).

3.1.1 Lipossomas

Os lipossomas foram os pioneiros na geração de nanocarreadores de medicamentos (BUDAI; SZÓGYI, 2001), separadas por compartimentos de água. Foram descobertos por Bangham em 1965 (BANGHAM *et al.*, 1965; CHANG; YEH, 2012), sendo constituídos por lipídios naturais ou sintéticos com natureza anfifílica e um grupo de cabeças polares covalentemente ligado a um ou dois caudas de hidrocarbonetos hidrofóbicos (FRÉZARD, 1999).

Após a descoberta destes, três décadas depois o primeiro medicamento lipossômico Ambisome® entrou no mercado (DAVIDSON *et al.*, 1994; HANN; PRENTICE, 2001). A partir disso, a relação de fármacos lipossomais segue em crescimento (ALLEN; CULLIS, 2013). Os lipídios que os compõem são, normalmente, biocompatíveis e biodegradáveis e se assemelham aos encontrados em membranas biológicas (MASSERINI, 2013; LAMICHHANE *et al.*, 2018). Além disso, podem diferir em tamanho, número de lamelas, composição de superfície, lipídios utilizados, volume e composição do meio aquoso interno (FRÉZARD *et al.*, 2005).

Os nanoestruturados são altamente versáteis, permitindo a encapsulação de drogas hidrofílicas no meio aquoso, substâncias hidrofóbicas na bicamada lipídica. Na superfície dos lipossomas algumas modificações podem ser realizadas de acordo com a interação, agentes biológicos e destino que se desejam alcançar (KYLE; SAHA, 2014; LI *et al.*, 2017), além desses compostos, também pode-se encapsular gases que permitam sua administração intravenosa (FIX *et al.*, 2015; PENG *et al.*, 2013).

Uma vez que o medicamento esteja dentro do lipossoma, se torna protegido contra ações fisiológicas como degradação enzimática, imunológica e inativação química, rápida depuração plasmática, resultando em aumento e prolongamento de sua ação. Outro benefício comum de encapsulação de lipossomas é a diminuição da exposição dos tecidos aos medicamentos, reduzindo os efeitos colaterais do tratamento (BOZZUTO; MOLINARI, 2015), além de proteção contra possíveis instabilidades como variação de pH, os lipossomas têm a vantagem de diminuir a dose terapêutica e o número de administrações, visto que a liberação é progressiva e controlada sendo favorável à clínica (PIMENTEL *et al.*, 2007).

Quando voltados para a administração de medicamentos, o tamanho desejável dos lipossomas deve variar entre 50 e 200 nm (HARASHIMA *et al.*, 1994; WOODLE, 1995). Diante disso, os processos de redução do tamanho e da lamelaridade dos lipossomas são

frequentemente realizados submetendo-os a homogeneização, sonicação, ciclos de extrusão ou congelamento / descongelamento (BRANDL *et al.*, 1990; FURUKAWA, 2010; HOPE *et al.*, 1985, 1986; JOHNSON *et al.*, 1971).

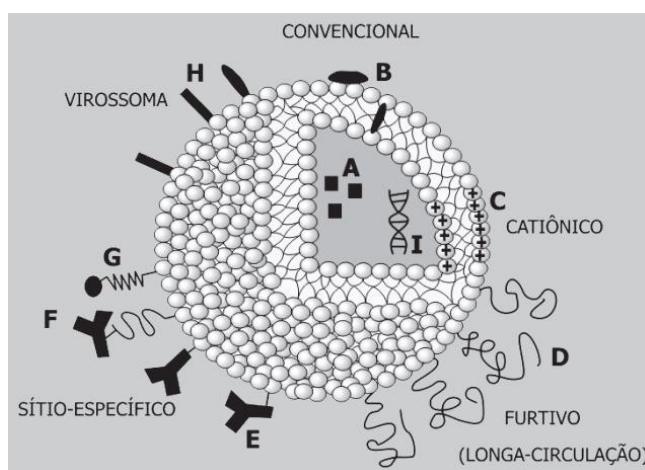
3.1.2 Tipos de Lipossomas

Os lipossomas podem ser classificados a partir das variações de tamanho e número de lamelas: vesículas unilamelares pequenas (SUV) com tamanho até 100 nm e uma bicamada; vesículas unilamelares grandes (LUV) com um tamanho superior a 100 nm e uma bicamada; e vesículas multilamelares (MLV) que podem chegar a vários nm e são, compostas por muitas bicamadas concêntricas (MASSERINI, 2013; FERNANDES *et al.*, 2018).

Os lipossomas podem ser classificados ainda pela metodologia utilizada para formulação: por exemplo, evaporação de fase reversa; vesícula de imprensa francesa e vesículas de injeção de éter (VEMURI; RHODES, 1995). Com o passar dos anos essas vesículas puderam ser otimizadas, passando por modificações estruturais para atuação em sítios específicos e por ação direta visando permitir uma atividade terapêutica mais eficiente (BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007). Dessa forma, os lipossomas geralmente são conhecidos como convencional, de longa circulação, catiônicos e direcionados sensíveis ao pH (Figura 1) (DARAEE *et al.*, 2016).

Os lipossomas do tipo convencionais são os mais simples (Figura 1A/B), comumente formados por fosfolípidos sintéticos e colesterol. Apesar de dispor de uma composição simplificada, eles podem superar duas grandes dificuldades na terapêutica, como a biodistribuição e o direcionamento para receptores específicos, sendo bastante eficazes (IMMORDINO *et al.*, 2006).

Figura 1 – Representação dos tipos de lipossomas



(A) fármaco hidrofílico no interior do lipossoma e (B) fármaco lipofílico adsorvido ou inserido na bicamada lipídica; catiônico (C); de longa circulação (*Stealth®*) – com polímero hidrofílico na superfície (D); sítio-específicos – (E), (F) com anticorpos ligantes e (G) com peptídeos e proteínas ligantes na superfície; virossomas – com envelope viral na superfície (H); (I) DNA-plasmídeo encapsulado em lipossomas catiônicos. Fonte: BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007.

Formulações lipossômicas do tipo convencional já se encontram disponíveis no comércio farmacêutico, com realce para o tratamento de pessoas imunossuprimidas portadoras de infecções fúngicas, ou alguns tipos de câncer (SCHERPHOF *et al.*, 1985).

A possível fagocitose dos lipossomas pelo sistema fagocitário mononuclear é um ponto negativo para a distribuição dos fármacos para outros tecidos. Para reverter esse embate, lipossomas de longa circulação foram desenvolvidos acrescentando o polietileno glicol (PEG) à superfície do lipossoma (ALLEN *et al.*, 1991).

Esta substância reduz a agregação de vesículas devido à formação de um filme hidratado na parte externa do lipossoma, melhorando a estabilidade da formulação. O PEG também cria um obstáculo, com efeito estérico impedindo a ligação de opsoninas à superfície lipossômica, reduzindo a captação pelo MPS (MILLA *et al.*, 2012).

Além dos convencionais temos os lipossomas catiônicos e sensíveis ao pH. Os lipossomas sensíveis ao pH foram criados, visto que alguns tecidos patológicos, tumores e áreas inflamadas, passam por alterações no pH. Durante essas condições, existe uma redução no pH dos tecidos, quando em comparação com tecidos normais (DE ARAÚJO LOPES *et al.*, 2013). Para esse tipo, os mais utilizados possuem uma mistura de fosfatidiletanolamina (PE) e um composto anfifílico com um grupo ácido protonável (carga negativa em pH fisiológico) (BATISTA *et al.*, 2007; DE ARAÚJO LOPES *et al.*, 2013; SIMÕES *et al.*, 2004).

A outra variedade são os lipossomas catiônicos, neste grupo encontram-se os lipossomas que foram propostos após a descoberta de lipídios catiônicos como o 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano (DOTAP). DOTAP é um composto que permite a formação de lipossomas catiônicos tendo como base outros constituintes da membrana, como colesterol e lipídios auxiliares (KHALIL *et al.*, 2018). Geralmente este tipo é utilizado na encapsulação de moléculas com cargas, como DNA e RNA (DE ARAÚJO LOPES *et al.*, 2013).

Ainda há os lipossomas de sítio específico ou direcionados, que também são bastante utilizados. Eles apresentam modificações em sua superfície, que permite uma melhora na especificidade e elevar a quantidade de fármaco no local desejado (BATISTA *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2018). Com isso, partículas de direcionamento, podem estar ligadas à superfície das vesículas, entre esses ligantes podem destacar: vírus, proteínas, moléculas que

interagem com receptores e anticorpos ou fragmentos de anticorpos (BATISTA *et al.*, 2007; DE ARAÚJO LOPES *et al.*, 2013).

3.2 SESQUITERPENOS

O grupo dos terpenos representa uma extensa família e diversificada de compostos naturais. Além de terpenos, também inclui esteroides e carotenoides, comportando cerca de 60.000 membros (BUCKINGHAM, 1997). Essas substâncias são derivadas do mesmo precursor com cinco unidades de carbono, inseridas linearmente, podendo sofrer ciclizações e depois se reorganizarem (GERSHENZON; DUDAVERA, 2007).

Os terpenos são constituídos a partir de unidades de isopreno unidade essa, derivada do 2- metilbutadieno, onde cada uma é formada por 5 carbonos, e podem ser classificados em monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15) e diterpenos (C20), sendo esses que compõem a maioria dos óleos voláteis (SIMÕES *et al.*, 2017), com base no número de unidades utilizadas. Em cada grupo, um substrato linear perde um grupo difosfato, geralmente cicliza e passa por uma variedade de rearranjos. É difícil estimar o número exato de sesquiterpenos encontrados na natureza (TIAN *et al.*, 2016). Na Tabela 1 temos as características físico-químicas dos sesquiterpenos utilizados no trabalho.

Tabela 1– Propriedades físico-químicas dos sesquiterpenos utilizados no estudo

Sesquiterpeno	Ponto de Fusão (°C)	Ponto de Ebulição (°C)	Densidade (g/mL)	Solubilidade em água (g/L)	Sinonímia
Bisabolol	----	153°C	0,920	----	(-)-alfa-Bisabolol, Levomenol
Farnesol	< 25°C	110-113°C	0,886	----	3,7,11-Trimethyl-2,6,10-dodecatrien-1-ol
Nerolidol	-75°C	263-266°C	0,880	0,014	3,7,11-Trimethyl-1,6,10-dodecatrien-3-ol
Trans Cariofileno	130°C	20°C a 14 mmHg	0,902	0,001	β-Cariofileno

Fonte: www.sigmaaldrich.com/

Os terpenos conferem atividades biológicas nos vegetais, como produção de toxinas contra herbívoros ou patógenos, ou como atrativos para polinizadores (GERSHENZON; DUDAVERA, 2007).

Esses compostos foram identificados como ativos presentes em várias espécies de plantas medicinais, com uma variedade de atividades biológicas, incluindo antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatório, antitumoral e anticolinesterase (HARNORNE; TOMÁS-BARBERAN, 199; HE *et al.*, 2019).

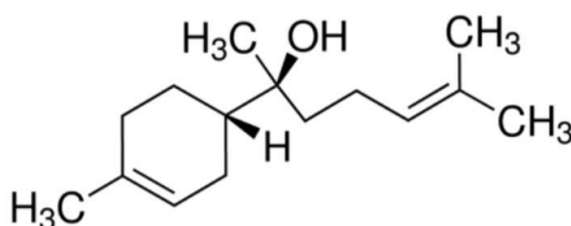
3.2.1 α - Bisabolol

Bisabolol é um álcool sesquiterpeno monocíclico que foi isolado pela primeira vez em 1951 por Isaac e colaboradores, a partir das flores de camomila (*Matricaria chamomilla*; Asteraceae) (BRUNKE; HAMMAERSCHMIDT, 1985). Conhecido também, como alfa, 4-dimetil-alfa- (4- metil-3-pentenil) -3-ciclo-hexeno-1-metanol, com a fórmula química $C_{15}H_{26}O$, bisabolol tem um aroma fraco de flora doce (PERBELLINI *et al.*, 2004).

Sendo caracteristicamente um composto extremamente lipofílico, com propensão a oxidar, o bisabolol é praticamente insolúvel na água, no entanto, solúvel em etanol (WALECZEK *et al.*, 2003). Dessa forma a atividade antimicrobiana de muitos sesquiterpenos, como bisabolol, foram relatadas apenas para um número limitado de patógenos. Por exemplo, bisabolol foi ativo contra bactérias Gram-positivas e fungos como *Candida albicans* (DUKE *et al.*, 2002).

O bisabolol é encontrado em óleos de plantas como *Arnica longifolia*, *Aster hesperius* e *Chrysothamnus nauseosus*, que possui várias atividades biológicas, incluindo anti-inflamatórias, antioxidantes e antimicrobiana (TABANCA *et al.*, 2007; LEITE *et al.*, 2017). Esse sesquiterpeno é comumente utilizado em cosméticos decorativos, fragrâncias finas, xampus, sabonetes e outros produtos de higiene pessoal (BHATIA; MCGINTY; LETIZIA, 2008). O α -bisabolol (Fig. 2), com dois centros quirais e existe como quatro estereoisômeros na natureza (GUNTHER *et al.*, 1993).

Figura 2 – Fórmula estrutural do α –Bisabolol.



Fonte: autoral, 2021

O efeito antimicrobiano do bisabolol foi avaliado utilizando o método de microdiluição em caldo. Embora o bisabolol tenha exibido fraca atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Escherichia coli*, no entanto, a atividade contra *C. albicans* foi significativa e comparável ao linalol (valores de MIC: 36 e 39 mM, respectivamente) (VAN ZYL *et al.*, 2006).

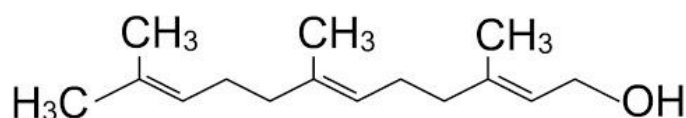
O α -bisabolol é um dos principais compostos onde seu encapsulamento pode ser adequado para aplicações biomédicas (DETONI *et al.*, 2009; PEDRO *et al.*, 2009). Dentre as inúmeras aplicações na indústria farmacêutica, destacam-se as atividades anti-inflamatória, antiespasmódica, propriedades anti-alérgicas, permeação de drogas e vermífugos (DE SOUZA *et al.*, 2008; PYBUS, 1999).

3.2.2 Farnesol

O farnesol é um álcool sesquiterpeno com quinze carbonos, gerado pela desfosforilação de farnesil pirofosfato durante a via biossintética do mevalonato (Fig. 3) e em células de levedura, tem sido relatada como molécula de *Quorum Sensing* (QS) em *Candida albicans* (MARCH; EIROS, 2013). Pode ser encontrado em diversas fontes naturais dentre elas, vegetais, frutas e ervas (como pêssegos, tomates, milho, capim-limão e camomila) (DUNCAN; ARCHER, 2008; KHAN; SULTANA, 2011; WU *et al.*, 2019).

Esse processo de QS é realizado possibilitando a comunicação entre as células microbiana, com a produção de pequenas moléculas que se difundem e que coordenam o comportamento do microrganismo, geralmente em fungos e bactérias, tem atuação específica para uma espécie ou estirpe. O farnesol foi a primeira molécula QS encontrada em célula eucariótica (LEONHARDT *et al.*, 2015).

Figura 3 – Fórmula estrutural do Farnesol.



Fonte: autoral, 2021

Farnesol atua como uma molécula de QS que suprime a extensão das hifas e a formação de biofilme em populações densas de fungos (HORNBY *et al.*, 2001; DAVIS-HANNA *et al.*, 2008; DE SALAS *et al.*, 2015).

Experimentos utilizando farnesol exógeno pode-se observar a atividade de bloqueio do dimorfismo, que é a transição de levedura para filamentos e a formação de biofilme, apresentando um efeito notável, porém dose dependente e em altas concentrações ($\geq 100 \mu\text{M}$) e nos estágios iniciais da formação do biofilme (JABRA- RIZK; SHIRTLIFF; JAMES, 2006; MOSEL *et al.*, 2005; RAMAGE; SAVILLE; WICKES, 2002; WU *et al.*, 2019).

Esse composto possui diversas atividades biológicas comprovadas, como antimicrobiana, inibe e/ou reduz a formação de o biofilme, ainda pode aumentar a suscetibilidade microbiana aos antibióticos (MARCH; EIROS, 2013; CORDEIRO *et al.*, 2013), além do potencial antiproliferativo, antihistamínico, anti-inflamatórios e efeito indutor de apoptose em tumores (KU; LIN, 2015; LEE *et al.*, 2015; JOO; JETTEN, 2010; KATRAGKOU *et al.*, 2015).

O farnesol foi ativo na resistência ao estresse (WESTWATER; BALISH; SCHOFIELD, 2005) possui efeito citotóxico em *C. albicans*, bem como outros microrganismos, induzindo apoptose em certas concentrações sob condições ambientais específicas (LANGFORD *et al.*, 2013).

A atuação do farnesol *in vitro* com atividade aditiva ou sinérgica com diversos fármacos antifúngicos também já foi demonstrado (KATRAGKOU *et al.*, 2015) ou em biofilme com diferentes espécies (FERNANDES *et al.*, 2016), podendo ser útil na terapia combinada de medicamentos no tratamento de infecções fúngicas (POLKE *et al.*, 2018). O aumento da suscetibilidade ao fluconazol já foi relatado em estudos anteriores frente a biofilmes, provavelmente via regulação e biossíntese do ergosterol (YU *et al.*, 2012).

3.2.3 Nerolidol

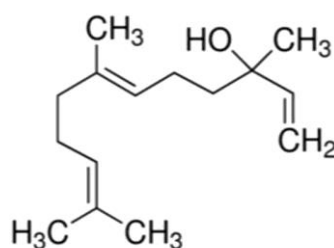
O nerolidol é um álcool sesquiterpeno alifático (Fig. 4), que pode ser encontrado em óleos essenciais extraídos de diversas espécies de vegetais. Por ser comum na alimentação humana, o nerolidol foi aprovado pela *Food and Drug Administration* dos Estados Unidos da América como alimento e agente aromatizante (ALONSO *et al.*, 2019).

Esse composto é comumente utilizado na formulação de perfumes, xampus, sabões e outros produtos de higiene pessoal, assim como em produtos de limpeza não cosméticos, sendo destacado por ter um consumo mundial entre 10 e 100 toneladas/ano (LAPCZYNSKI *et al.*, 2008; MCGINTY; LETIZIA; API, 2010). O nerolidol pode ser encontrado nos óleos essenciais de citronela, neroli, capim-limão, gengibre e rosa. Este composto tem uma ampla

gama de funções biológicas importantes, com destaque para antimicrobiana (BREHM-STECHER; JOHNSON, 2003; TAO; WANG; KONG, 2013).

Este composto, também chamado de 1,6,10- Dodecatrien-3-ol, 3,7,11-trimetil-1,6,10-dodecatrien- 3-ol ou 3,7,11-trimetildodeca-1,6,10-trien-3-ol, pode ser encontrado como dois isômeros (E e Z) e está presente em óleos essenciais derivados de várias plantas (MCGINTY; LETIZIA; API, 2010; DE CARVALHO *et al.*, 2018), como: *Piper gaudichaudianum* Kunth (SPEROTTO *et al.*, 2013), *Baccharis dracunculifolia* DC (KLOPELL *et al.*, 2007), *Nectandra megapota* Spreng (MARIN *et al.*, 2010), *Zingiber officinale* Roscoe (SASIDHARAN; NIRMALA, 2010), *Leptospermum flavescens* Myrtaceae (DEMUNER *et al.*, 2011), *Piper arboretum* Aubl. (CYSNE *et al.*, 2005), *Lavandula angustifolia* Miller (VENSKUTONISA; DAPKEVICIUSA; BARANAUSKIENE, 1997), entre outros, e apresenta várias propriedades farmacológicas descritas na literatura (DE CARVALHO *et al.*, 2018).

Figura 4 – Fórmula estrutural do Nerolidol.



Fonte: autoral, 2021

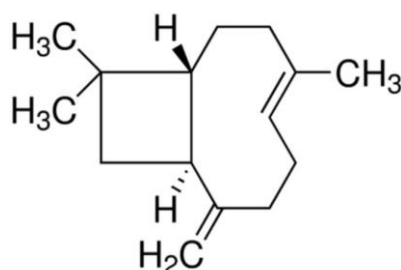
Um estudo recente (CHAN *et al.*, 2016) verificou atividade biológica do nerolidol *in vitro* frente a células cancerígenas (TRIANA *et al.*, 2013), bactérias (BREHM- STECHER; JOHNSON, 2003), fungos (PARK *et al.*, 2009; JOHANN *et al.*, 2012) e *Trypanosoma* (HOET *et al.*, 2006), *Leishmania* (ARRUDA *et al.*, 2005), malária (GOULART *et al.*, 2004; SAITO *et al.*, 2016) e babesia (ABOULAILA *et al.*, 2010).

De fato, esse sesquiterpeno possui atividades biológicas significativas, porém alguns fatores restringem o uso do nerolidol, como sua insolubilidade em água e sua fácil degradação na presença da luz (MCGINTY; LETIZIA; API, 2010). Portanto, uma abordagem promissora para permitir o uso mais amplo de nerolidol é o desenvolvimento de sistemas de nanoestruturados que podem efetivar suas propriedades físico-químicas (AZZI *et al.*, 2018).

3.2.4 *Trans*- Cariofileno

O cariofileno ou (-) β -cariofileno ou *Trans* cariofileno é um sesquiterpeno bicíclico natural (Fig. 5), que pode ser encontrado em muitos óleos essenciais, notadamente no óleo de cravo, cânhamo, alecrim e lúpulo (GHELARDINI *et al.*, 2001).

Figura 5 – Fórmula estrutural do *Trans*- cariofileno.



Fonte: autoral, 2021

O cariofileno também exerce algumas das atividades biológicas já relatadas são, como efeito anti-inflamatório, atividade antiespasmódica, alívio da asma, inibição da reação imune hipersensível (CHO *et al.*, 2007; GALDINO *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 1998; SHAN; CHEN; LU, 2017), atividade neuroprotetora (KLEIN- JÚNIOR *et al.*, 2016), gastroprotetora (TAMBE *et al.*, 1996), ansiolíticas (GALDINO *et al.*, 2012), e anestésicas (GHELARDINI *et al.*, 2001).

Além dessas propriedades, o *Trans*-cariofileno mostrou inibição frente a bactérias gram-negativas e gram-positivas (DAHAM *et al.*, 2015), além de atuar também reduzindo o crescimento de biofilmes de *Streptococcus mutans*, (YOO; JWA, 2018) e doenças periodontais (YOO; JWA, 2019).

Em relação aos efeitos citotóxicos, estudos anteriores revelaram que o *Trans*-cariofileno possui baixa toxicidade e alta aplicabilidade (SITAREK *et al.*, 2017). *Trans*-cariofileno (TC) é um dos mais importantes sesquiterpenos naturais presentes nos óleos essenciais de muitas plantas medicinais (FERNANDES *et al.*, 2007).

No entanto, algumas dificuldades para aplicabilidade são encontradas como a sua alta volatilidade, reduzida solubilidade em água e fotosensibilidade e alta temperatura (CEVALLOS *et al.*, 2010; SKOLD *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2011).

Destes entraves, a baixa solubilidade em água pode diminuir substancialmente a biodisponibilidade da droga e, portanto, limitar sua aplicação no campo farmacêutico. Diante disso, a descoberta de um sistema de entrega controlada de drogas para melhorar sua

solubilidade e taxa de dissolução de modo a melhorar a biodisponibilidade tem sido uma tarefa importante em desenvolvimento farmacêutico (WEMPE *et al.*, 2008).

3.3 GÊNERO *Candida* spp.

O gênero *Candida* engloba espécies consideradas patógenos oportunista aos humanos. Estudos indicaram *Candida* como a terceira causa mais comum de infecções da corrente sanguínea associadas aos serviços de saúde no mundo (PAPPAS *et al.*, 2018; MACHADO *et al.*, 2021). Estima-se que 250.000 pessoas são acometidas por infecções fúngicas invasivas por ano e que essas infecções resultam em pelo menos 50.000 mortes (MCCARTY; PAPPAS, 2016; KULLBERG; ARENDRUP, 2016; PAPPAS *et al.*, 2018).

Morte e patologias causadas por fungos transformaram-se em um problema de saúde mundial, afligindo grande parte dos pacientes que tenham *deficit* imunitário. Nos últimos anos houve uma elevação do número de casos de infecções fúngicas devido às intervenções médicas como tratamentos quimioterápicos oncológicos, imunossupressão para transplantes ou infecção por HIV (PFALLER; DIEKEMA, 2010). Os fungos patogênicos são os microrganismos responsáveis por bilhões de infecções anualmente, com 51,5 milhões de mortalidades atribuíveis (BROWN *et al.*, 2012).

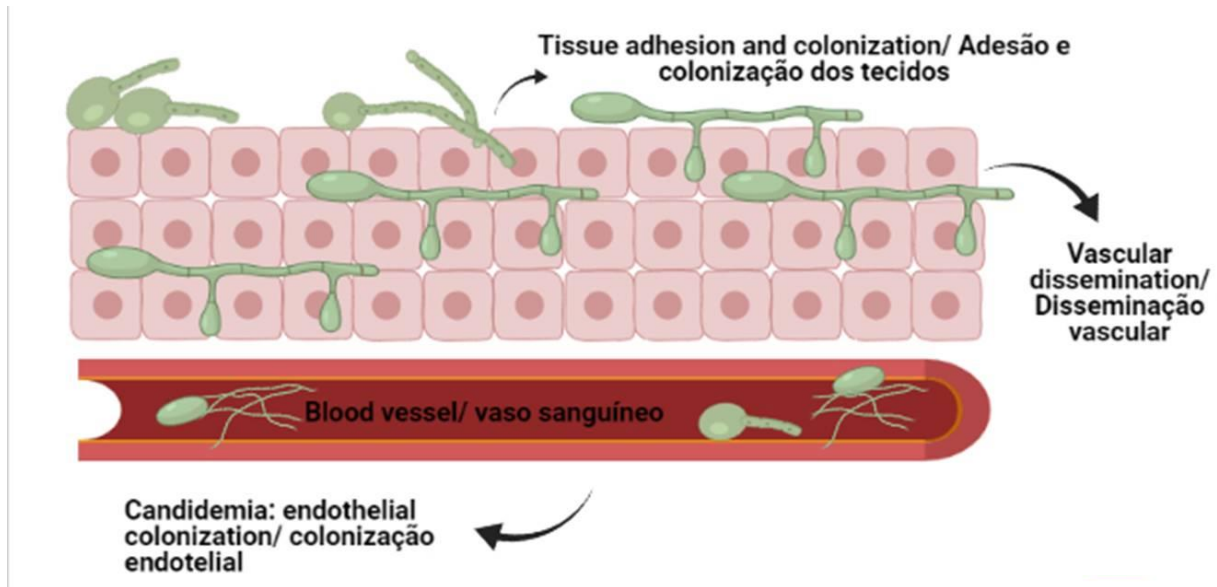
Ademais, essas infecções são constantemente negligenciadas, pois mais de 300 milhões de pessoas sofrem de micoses graves em todo o mundo, com uma elevada mortalidade de mais de 1,5 milhões (1,5 a 2 milhões) ao ano. Esta mortalidade é semelhante à doenças como tuberculose ou malária (BROWN *et al.*, 2012; SCHMIEDEL; ZIMMERLI, 2016; JAMIU *et al.*, 2021).

Nesse contexto, destacam-se as espécies de *Candida*, pertencendo aos fungos predominantemente isolados em dispositivos médicos contaminados e representam aproximadamente 15% dos casos de sepse oriundas de hospitais (NOBILE; JOHNSON, 2015).

Candida albicans e outras espécies emergentes de não- *albicans*, incluindo *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* revelam serem causadoras de infecções sistêmicas no mundo, sendo também, a causa de infecções superficiais, como infecções vaginais e mucosas, podendo também, em condições compatíveis, causarem infecções profundas e entrarem na corrente sanguínea (CONTI *et al.*, 2014, TURNER; BUTLER, 2014, WHALEY *et al.*, 2017; DADAR *et al.*, 2018).

A candidemia corresponde a uma infecção fúngica na corrente sanguínea (Fig. 6), geralmente adquirida em hospitais, que podem levar a sepse e consequentemente ao choque séptico. A candidemia também está associada a 80% de mortalidade (PERLROTH; CHOI; SPELLBERG, 2007; GUDLAUGSSON *et al.*, 2003; MACHADO *et al.*, 2021).

Figura 6 – Patogênese da invasão tecidual e sanguínea por *Candida* spp.



Fonte: autoral, 2021

A incidência de candidemia aumentou dramaticamente nos últimos trinta anos, devido ao uso constante de agentes imunomoduladores, antimicrobianos de amplo espectro e cateteres vasculares (LAMOTH *et al.*, 2018). Espécies do gênero *Candida* também são responsáveis por infecções crônicas em internados na UTI e em crianças hospitalizadas, levando a importantes custos com a saúde (GUDLAUGSSON *et al.*, 2003, FRIDKIN *et al.*, 2006, STEINBACH, 2016).

Mesmo com o avanço da tecnologia em diagnóstico, o tratamento e a prevenção da candidíase invasiva ainda é um desafio, principalmente por apresentar aspectos clínicos inespecíficos (BEASLEY; PANACH; DOMINGUEZ, 2016; ZUZA-ALVES; SILVA-ROCHA; CHAVES, 2017). Com isso, os dados reais da epidemiologia e a incidência de candidíase invasiva não são bem conhecidos (BARAC *et al.*, 2020).

Os fatores de risco mais relevantes para incidência de *Candida* são nutrição parenteral, uso de antibióticos de amplo espectro, imunossupressão induzida por radioterapia ou quimioterapia, procedimentos invasivos em mucosas e dispositivos médicos de longa

permanência (por exemplo, cateteres venosos centrais) (DIMOPOULOS *et al.*, 2008, LEROY *et al.*, 2009; MACHADO *et al.*, 2021)

Com isso, foram estabelecidas cinco classificações utilizadas para compreender a resposta em associação aos danos resultantes das infecções, são estes: resposta imunológica do hospedeiro, o local anatômico da infecção, a virulência de *Candida*; a morfologia das hifas e expressão gênica específica de hifas como fatores críticos para a virulência (THOMPSON *et al.*, 2011, JABRA- RIZK *et al.*, 2016).

3.3.1 *Candida albicans*

Candida albicans é um membro da microbiota humana, como também uma levedura polimórfica e é comumente encontrado no ser humano na superfície das mucosas, trato gastrointestinal (GI), respiratório e geniturinário. Comumente é um fungo comensal inofensivo, no entanto, em certas condições, pode se tornar um patógeno oportunista em indivíduos imunocomprometidos ou imunologicamente inapto (KASHEM *et al.*, 2015).

A capacidade de alterar sua situação de microrganismo comensal para patógeno infeccioso é de grande interesse para a compreensão clínica, visto que, os detalhes desse mecanismo ainda permanecem incompreendidos. Uma das evidências aponta que a mudança patogênica é principalmente uma consequência do estado imunitário, sendo um somatório de fatores, incluindo ambiente (MALLICK; BENNET, 2013), uso de medicamentos imunossupressores e infecção ou comorbidades pré-existentes (FESTEKJIAN; NEELY, 2011; LEROY *et al.*, 2009; TODA *et al.*, 2019; HO *et al.*, 2021).

Os últimos relatórios apontam que infecções sistêmicas por *C. albicans* levam a uma taxa de mortalidade cerca de 40% (GUNSALUS *et al.*, 2016). Essa levedura é a principal espécie responsável candidíase invasiva (46,3%), seguida pela *C. glabrata* (24,4%) e *C. parapsilosis* (8,1%) (ANDES *et al.*, 2016). Por ser um patógeno comensal, espécies de *Candida* podem se adaptar às condições ambientais dos hospedeiros, mesmo quando a biodisponibilidade dos nutrientes é restrita (MIRAMÓN; LORENZ, 2017).

Com o passar do tempo, paralelamente à modernização dos procedimentos médicos, o número de infecções por *Candida* na corrente sanguínea tornou-se elevado assim como a taxa de mortalidade associada, sendo *C. albicans* o microrganismo isolado mais frequente em amostras biológicas de pacientes (SEGAL *et al.*, 2007; PFALLER; DIEKEMA, 2007; COSTA-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2008; QUINDÓS, 2014; PAPPAS *et al.*, 2018).

A Unidade de Terapia Intensiva (UTI) é um ambiente que fornece a *C. albicans* oportunidade para a proliferação de infecção. A colonização da pele e membranas mucosas e a alteração ou descontinuidade das barreiras do hospedeiro, como feridas, cirurgia e a inserção de cateteres intravasculares internos são os principais fatores predisponentes para infecções por *Candida* (COSTA-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2008; DIMOPOULOS *et al.*, 2007; BLUMBERG *et al.*, 2001).

Sabendo que essa espécie é capaz de sofrer dimorfismo, existem vários mecanismos relevantes que regulam a morfogênese e a patogenia durante a infecção por *C. albicans* (KADOSH; LOPEZ- RIBOT, 2013). O microrganismo utiliza a glicose como fonte preferencial de carbono através de abordagens antecipadas que induzem ao transporte e metabolismo da glicose (SABINA; BROWN, 2009).

3.3.2 *Candida tropicalis*

Candida tropicalis é uma levedura comumente encontrada em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), sendo responsável por 5-10% das infecções por fungos em UTI (YANG *et al.*, 2013). Nesse contexto, pode ser encontrada também em pacientes em uso de cateteres, neutropenia e pacientes oncológicos (NUCCI; COLOMBO, 2007; YESUDHASON; MOHANRAM, 2015; KOTHAVADE *et al.*, 2010).

C. tropicalis se tornou uma das espécies clínicas mais comuns deste gênero, especialmente em regiões tropicais (KOTHAVADE *et al.*, 2010; RODRIGUEZ *et al.*, 2017; MEDEIROS *et al.*, 2019). Em alguns setores, as infecções sanguíneas por *C. tropicalis* foram associadas com maior mortalidade do que infecções com outras espécies de *Candida* (COLOMBO *et al.*, 2007). Além disso, *C. tropicalis* tem ganhado destaque por sua resistência ao fluconazol (FAN *et al.*, 2017; PFALLER *et al.*, 2019) que pode implicar infecções persistentes (DE SOUZA *et al.*, 2021).

Consideravelmente, na fase de neutropenia e inflamação das mucosas, *C. tropicalis* apresentou uma maior virulência em comparação com *C. albicans* (YU *et al.*, 2015; DEORUKHKAR; SAINI; MATHEW, 2014), devido a sua destacada habilidade em formar biofilmes e apresentarem resistência aos azóis (GALAN-LADERO *et al.*, 2019), podem também ampliar a permeabilidade dos vasos, exprimindo-se atipicamente com síndromes hemorrágicas ou lesões na pele (BEASLEY; PANACH; DOMINGUEZ, 2016; SHARON; EISEN; FUNG, 2010).

3.3.3 *Candida krusei*

Candida krusei foi descrita como um agente causador de infecções fúngicas sistêmicas em pacientes suscetíveis, resultando nas menores taxas de sobrevivência, entre 90 dias (53,6%) entre *Candida* spp. comum (PFALLER *et al.*, 2012). Embora a prevalência de *C. krusei* permaneça baixa (2%) entre infecções fúngicas (PFALLER *et al.*, 2011), sua resistência intrínseca ao fluconazol aumenta preocupação epidemiológica e terapêutica.

Essa espécie tem se revelado como um patógeno hospitalar, acometendo geralmente, pacientes portadores de cânceres hematológicos e/ou submetidos a transplante de medula óssea (WEN *et al.*, 1995). *C. krusei* é a quarta espécie não-*albicans* mais comum relacionada à candidíase invasiva e à candidemia, representando aproximadamente de 2,7% das espécies não-*albicans* isoladas nos Estados Unidos (PFALLER *et al.*, 2014).

Além disso, o número de isolados desta levedura nestes tipos de infecções aumentou ao longo do tempo (PFALLER *et al.*, 2014). Em particular, os pacientes com malignidades hematológicas e transplantes de medula óssea demonstraram estar em maior risco de infecção por *C. krusei* (WINGARD *et al.*, 1991; PFALLER *et al.*, 2008).

Essa espécie apresenta um potencial multirresistente, devido à sua resistência intrínseca ao fluconazol (com mais de 97% dos isolados exibindo resistência) bem como seu rápido desenvolvimento de resistência adquirida a outros fármacos antifúngicos (WHALEY *et al.*, 2017; PAPPAS *et al.*, 2016; ROBBINS; CAPLAN; COWEN, 2017; JAMIU *et al.*, 2021).

Sendo essa espécie intrinsecamente resistente ao fluconazol, alguns estudos apontam a resistência inata ao azole de *C. krusei* à atividade de bomba de efluxo, nomeadamente através do transportador de cassete de ligação a ATP Abc1p e redução da acumulação de drogas, no entanto os mecanismos ainda não são precisamente compreendidos (KATIYAR; EDLIND, 2001; LAMPING *et al.*, 2009).

3.4 TERAPIA ANTIFÚNGICA

Para Terapia Antifúngica as opções de tratamento ainda são restritas, visto que, existe um número reduzido de classes de antifúngicos. Com isso, o manejo clínico para doenças fúngicas pode se tornar comprometido, pelo fato do surgimento de resistência às drogas existentes. No mercado existem três classes principais de medicamentos antifúngicos: os azólicos, as equinocandinas e os polienos. Anfotericina B é usada para o tratamento de patologias fúngicas invasivas. Dentre os azóis, triazóis de segunda geração, como

voriconazol, itraconazol, posaconazol e isavuconazol são usados principalmente para outras infecções por fungos (PAPPAS *et al.*, 2009; WALSH *et al.*, 2008; HADRIC; AYADI, 2018).

Uma das principais drogas utilizadas nos hospitais e na atenção básica é fluconazol, que pertence à categoria dos azólicos, mas a capacidade de resistência do gênero *Candida* a essa droga tem sido observada, além de inata resistência, como é o caso de *Candida. krusei* (BERKOW; LOCKHART, 2017).

Atualmente, vários fármacos podem ser utilizados no tratamento das infecções causadas por fungos (Tabela 2), porém, essa “diversidade” torna-se relativamente pequena, quando lembramos o arsenal de drogas disponíveis para o tratamento de infecções bacterianas (SILVA, 2016). Ademais, no Brasil as equinocandinas não são disponíveis no Sistema Único de Saúde (SUS) (RENAME, 2020).

Tabela 2 – Fármacos antifúngicos e seus alvos celulares

CLASSE	FÁRMACO	ALVO NA CÉLULA	EFEITO
POLIENOS	Anfotericina B	Ergosterol	Fungicida
AZÓLICOS	Fluconazol Itraconazol Voriconazol Posaconazol	Síntese do ergosterol	Fungistático
EQUINOCANDINAS	Caspofungina Micafungina Anidulafungina	Síntese de β -(1, 3)-D- glucano	Fungicida
ANÁLOGOS DE NUCLEOSÍDEOS	Flucitosina	Síntese do DNA e RNA	Fungistático

Fonte: (Adaptada de Cuenca-Estrella, 2010; Sardi *et al.*, 2013).

Além disso, muitos desses agentes antifúngicos que foram recentemente desenvolvidos apresentam limitações relevantes que estão relacionadas ao seu campo de atividades, propriedades físico-químicas e biofarmacêuticas, farmacocinética, interações medicamentosas e propriedades farmacodinâmicas (LEWIS, 2011).

3.4.1 Azólicos: Fluconazol

Os antifúngicos azólicos são compostos que possuem ambas as porções imidazol e triazol. Eles são a classe de antifúngicos mais amplamente utilizada em uso clínico, devido

seu impressionante perfil de segurança e disponibilidade em formulações orais e intravenosas (ROEMER; KRYSAN, 2014).

A atuação dos azóis ocorre quando uma porção heterocíclica liga-se a um átomo de ferro no grupo heme, que se encontra no sítio ativo do lanosterol 14- α desmetilase (também conhecido como citocromo P45014DM e Erg11). Esta ligação impede a desmetilação do lanosterol, consequentemente com a redução do ergosterol e o aumento da concentração de substâncias tóxicas intermediários de esterol, que resulta no impedimento do crescimento e divisão, levando a um enfraquecimento severo na membrana (SHAPIRO; ROBBINS; COWEN, 2011; OSTROSKY-ZEICHNER *et al.*, 2010).

Sendo considerado recente no mercado, passaram por um período de atraso de mais de 20 anos, os medicamentos azólicos de primeira geração, incluindo fluconazol e itraconazol foram introduzidos nos anos 90. Posteriormente, foram inseridas no mercado as equinocandinas (anidulafungina, caspofungina e mycafungina em 2002-2006) e drogas azólicas de segunda geração, incluindo voriconazol, posaconazol nos anos 2000 (NETT; ANDES, 2016).

Dentre as características dos azóis destaca-se sua atividade fungistática, sendo o voriconazol uma exceção na classe, que apresenta atividade fungicida contra *Aspergillus fumigatus*. A natureza dos azóis impõe uma forte seleção direcionada para a evolução da resistência. Além disso, várias espécies de *Candida* como *Candida glabrata* e *Candida krusei* são intrinsecamente menos suscetíveis a essa classe de drogas (ROBBINS; WRIGHT; COWEN, 2017).

Avanços nas pesquisas na busca por novos agentes antifúngicos levaram à disponibilidade de novas gerações com melhores resultados terapêuticos em grupos de pacientes vulneráveis (NETT; ANDES, 2016). O uso de sistemas carreadores pode ser justificado, devido a vários medicamentos antifúngicos serem hidrofóbicos, levando a reduzida solubilidade em água, baixa biodisponibilidade oral e formulação limitada (LEWIS, 2011).

4 MATERIAIS E MÉTODO

4.1 PREPARAÇÃO DOS SISTEMAS NANOESTRUTURADOS

Foram utilizados os lipídios dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dipalmitoilfosfatidilserina (DPPS) e colesterol com > 99% de pureza (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, Missouri, Estados Unidos). Os lipídios foram pesados na proporção de 5:3:1 (mg) de DPPC:COL:DPPS. Cada sesquiterpeno foi adicionado ao tubo (1 µL) e os componentes foram dissolvidos com 1 mL de solução clorofórmio/metanol (1:1), (> 99% de pureza- Dinâmica Reagentes- Diadema, São Paulo, Brasil). Os solventes foram evaporados em nitrogênio (White Martins, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil) formando um filme na parede do tubo, que foi mantido em dessecador *overnight* (por 18 horas). Após este período, foi adicionado 1 mL de tampão PBS (Phosphate Buffer Saline 1,0M pH 7,2) e o tubo foi submetido ao agitador e banho-maria (57 °C) repetidas vezes para ressuspender os lipossomas, formando uma emulsão. Esta foi submetida a um extrusor (LiposoFast™, Avestin) com membranas de polycarbonato com poros de 200 nm de diâmetro, por 40 vezes, para produzir uma população de lipossomas com tamanho uniforme (BARROS *et al.*, 2013). Lipossomas sem a incorporação dos compostos foram utilizados como controle.

4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADOS: ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO, POTENCIAL ZETA MÉDIO, TAMANHO VESICULAR E MORFOLOGIA.

A determinação do tamanho de partícula foi realizada a 25°C, utilizando-se diluições seriadas com água milli Q nas proporções de 1:10, 1:20, 1:50 e 1:100 através de medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS). A distribuição do tamanho de partícula foi obtida pelo índice de polidispersão (IP). As medidas do potencial zeta médio das partículas foram realizadas a 25°C, pela técnica de microeletroforese associada à Anemometria *Doppler* de *Laser*, através da submissão da amostra a um campo elétrico. As análises foram realizadas no equipamento *Zetasizer Nano ZS*, (Malvern, versão 6.20). A forma e morfologia dos lipossomas foram observadas usando um microscópio eletrônico de varredura (FEG Quanta 450 EDS / EBSD).

4.3 ENSAIOS ANTIFÚNGICO

4.3.1 Cepas e meios de cultura

As cepas utilizadas foram do tipo padrão obtidas da Coleção de Cultura Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) do Instituto Brasileiro de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), CA INCQS 40006, CT INCQS 40042, e CK INCQS 40095. O meio de cultura onde as cepas foram inoculadas foi o *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA, KASVI) e incubadas durante 24 h a 37° C. Após esse processo, uma pequena amostra das colônias foram transferidas para tubos de ensaio contendo cada um 3 mL de solução de cloreto de sódio estéril (0,9%), concentração foi medida pela escala de 0.5 de *McFarland* (NCCLS, 2002). O Caldo Sabouraud Dextrose (SDB, HIMEDIA), duplamente concentrado foi utilizado nos testes de microdiluição. Na análise micromorfológica foi usado o *Potato Dextrose Agar* (PDA) empobrecido, acrescido de ágar bacteriológico.

4.3.2 Drogas, reagentes e preparação de soluções

Todos os sesquiterpenos foram obtidos pela empresa *Sigma Aldrich* (St. Louis, Missouri, Estados Unidos). O Dimetil Sulfóxido (DMSO, Merck, Darmstadt, Alemanha) foi utilizado para a diluição dos óleos e o fluconazol antifúngico (Cápsula – Prati donaduzzi), diluído em água destilada. A solução do produto foi preparada pesando 0,15 g dos produtos e depois diluímos em 1 mL de DMSO. Para obter a concentração desejada para o teste, os produtos foram rediluídos em água destilada estéril (16384 µg/mL) de modo que a concentração de DMSO não exercesse qualquer atividade nas células dos testes (STOPPA *et al.*, 2009).

4.3.3 Determinação da CI_{50} e obtenção da curva de viabilidade celular

As soluções foram preparadas em tubos *eppendorf* contendo cada um 1 mL de solução, o qual foi composto por 900 µL de meio de cultura (Caldo Sabouraud Dextrose-BSD) e 100 µL de suspensão fúngica com 10^6 UFC de acordo com a escala de MacFarland. A placa foi preenchida na direção numérica adicionando 100 µL dessa solução a cada poço e, em seguida, a microdiluição seriada foi realizada com a solução de 100 µL do sesquiterpeno desejado ou fluconazol, as concentrações variaram de 8192 a 8 µg/mL. Poços contendo

apenas o inóculo no meio BSD foram usados como controle de crescimento. Foram também realizados controles de diluentes, nos quais o inóculo foi substituído por cloreto de sódio 0,9% e meio estéril. Todos os testes foram realizados em quadruplicata. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e, em seguida, as leituras foram realizadas a 630 nm em espectrofotômetro (Thermoplate®). Os dados foram usados para determinar a viabilidade celular e calcular o IC₅₀ de cada tratamento, conforme descrito anteriormente. O último poço não continha nenhum produto ou medicamento e serviu de controle de crescimento fúngico (JAVADPOUR *et al.*, 1996). Os resultados obtidos na leitura ELISA foram utilizados para construir a curva de viabilidade celular e a CI₅₀ (MORAIS-BRAGA *et al.*, 2016).

4.3.4 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Para este teste, a ponta de uma haste estéril foi inserida em cada poço da placa do teste anterior (exceto no controle de esterilidade). Depois de misturar o meio em cada poço, a haste foi levada a uma placa de Petri contendo SDA, com auxílio de uma cartela guia fixada no fundo da placa para a subcultivo das leveduras e verificando a viabilidade celular. Após 24 h de incubação, as placas foram inspecionadas para qualquer formação de colônias de *Candida* (ERNST *et al.*, 1999, com modificações). A concentração em que não houve crescimento de colônias de fungos foi considerada a Concentração Fungicida Mínima (CFM) do produto natural.

4.3.5 Avaliação do efeito modificador da ação do fluconazol

Inicialmente foi verificada a ação dos sesquiterpenos e do fluconazol, individualmente sob o crescimento de leveduras. Neste teste foi avaliado o efeito da associação dos compostos com o fluconazol, para que se constate se houve ou não potencialização da ação do antifúngico pelo composto testado. Para tanto, utilizou-se os compostos em concentração subinibitória Concentração Matriz- CM (16384 µg/mL) (CM/16) adaptado de Coutinho *et al.* (2008). As placas foram preenchidas com 100 µL em cada poço contendo nessa quantidade meio, inóculo e o produto a ser testado, em seguida microdiluídas com 100 µL do fluconazol na concentração de 16384 µg/mL foram adicionados no primeiro poço da coluna, para que sofresse diluição seriada em concentrações que variaram de 8 a 8192 µg/mL. Foram realizados controles de diluição dos sesquiterpenos (inóculo é substituído por salina), controle de crescimento e controle de esterilidade do meio. As placas foram incubadas

a uma temperatura de 37 °C por 24 horas. A leitura foi realizada em aparelho de espectrofotometria de ELISA (Thermoplate®).

4.3.6 Efeito dos compostos na morfologia fúngica

Para determinar se os compostos testados causaram alteração na morfologia fúngica, ao inibir o desenvolvimento de hifas, prepararam-se câmaras com lâminas de micromorfologia estéril para observação de leveduras. Foi utilizado 3 mL de *Potato Dextrose Ágar* (PDA) empobrecido por diluição, foram adicionados às câmaras, contendo as concentrações de produto natural CM/8 e CM/16. Alíquotas dos subcultivos foram retiradas das placas de Petri para fazer duas estrias paralelas no meio sólido (PDA), que foram posteriormente cobertas com uma lamínula estéril. As câmaras foram colocadas na incubadora durante 24 h (37°C) e inspecionadas e registradas por um microscópio óptico (AXIO IMAGER M2-3525001980-ZEISS- Alemanha) de luz usando uma objetiva 40X. Foi realizado um controle para o crescimento de levedura sem nenhum composto, bem como um controle com o fluconazol antifúngico escolhido para fins comparativos. Os ensaios foram realizados de acordo com Sidrin e Rocha (2010) e Mendes (2011), com algumas modificações.

Foram realizadas fotos de todas as lâminas em suas respectivas concentrações e cepas e foram analisadas através de medições, sendo estas a medida da estria inteira e o comprimento das extensões dos filamentos formados (hifas e pseudohifas) usando o software Zen 2.0 (CARNEIRO *et al.*, 2019).

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores das CI_{50} foram calculados por regressão não linear, a partir das equações das curvas calculadas com base em cada quadruplicata e foram expressas como média aritmética $\pm$ Erro padrão da média. A significância estatística foi calculada através de um teste ANOVA de uma via, com teste *post hoc de tukey*.

As curvas de crescimento fúngico foram calculadas como média aritmética $\pm$ Desvio padrão da média da quadruplicata. A significância estatística entre fluconazol (controle) e as substâncias, a cada concentração, foi calculada através de uma ANOVA de duas vias com teste *post hoc de Bonferroni*. Para a análise estatística, foi utilizado o software *Graphpad Prism*, v. 5.0.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADOS: TAMANHO VESICULAR, ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO E POTENCIAL ZETA MÉDIO

Na Figura 6 temos a caracterização dos lipossomas, obtida a partir de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), onde foi vista a morfologia dos mesmos (Fig. 7A), apresentando vesículas com padrão esférico regular e populações homogêneas com dimensões semelhantes. O farnesol lipossomal apresentou lipossomas com tamanhos maiores, essas variações de tamanho podem estar ligadas às características físico química do Farnesol, além de fatores ambientais, como temperatura e conservação dos mesmos em laboratório, podem influenciar, podendo causar instabilidade nas características dos lipossomas, levando-os a aglutinação ou ao inchaço dos mesmos, mesmo após a extrusão.

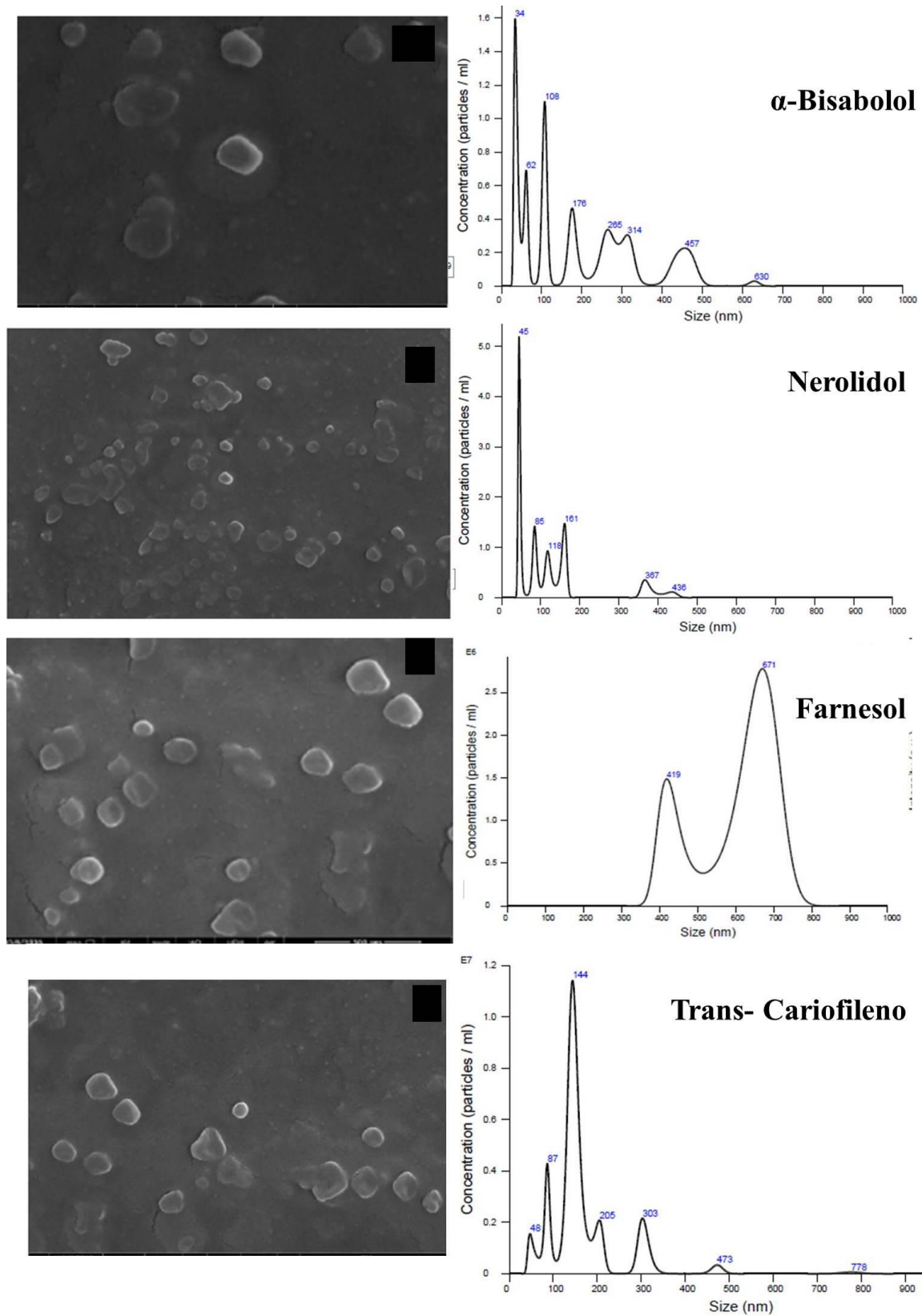
Na Tabela 3 temos os valores do tamanho vesicular, índice de polidispersão e o potencial zeta do controle e do Farnesol lipossomal, com tamanhos que variaram ao todo de 185,46 nm a aproximadamente 418,9 nm, sendo a média de 599 nm.

Tabela 3 – Caracterização dos lipossomas tamanho vesicular, quociente de dispersividade e potencial zeta.

Formulação	Tamanho (nm) ± SD	PI ± SD	Potencial Zeta (mV) ± SD
Controle dos lipossomas	185,46 ± 3,76	0,48 ± 0,01	- 40,9 ± 0,96
Bisabolol lipossomal	203,8 ± 147,7	0,52 ± 0,04	-34,2 ± 0,91
Farnesol lipossomal	418,9 ± 108,7	0,32 ± 0,02	-35,1 ± 0,1
Nerolidol lipossomal	132,3 ± 108,3	0,42 ± 0,02	-42,6 ± 0,91
Trans-Cariofileno lipossomal	143,8 ± 88,9	0,62 ± 0,04	-38,7 ± 0,89

Tamanho (nm: nanômetro) e o Potencial Zeta (mV) dos sesquiterpeno na forma lipossomal e controle dos lipossomas. As medições foram realizadas com amostras diluídas utilizando água como um meio de dispersão, a 25 ° C. PI = índice de polidispersividade, SD: Desvio Padrão.

Figura 7 – Exemplos de imagens por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e o gráfico do tamanho vesicular por concentração de partículas/mL.



Fonte: autoral, 2021

5.2 INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO E EFEITO MODIFICADOR DA AÇÃO DO FLUCONAZOL - CURVA DE VIABILIDADE CELULAR E IC₅₀

Na Tabela 4 temos a Concentração de Inibição de 50% do crescimento das colônias fúngicas (IC₅₀) dos compostos atuando isoladamente, tanto nas formas livres e lipossomais e logo em seguida temos os valores dos compostos, em sua concentração subinibitória (CM/16) associados ao Fluconazol. A Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos sesquiterpenos na forma livre, lipossomal, controle dos lipossomas e fluconazol corresponderam a uma concentração $\geq 16384 \mu\text{g/mL}$.

As concentrações das IC₅₀ ao todo variaram entre 2,48 a 65249,81 $\mu\text{g/mL}$. Os compostos nas formas isoladas e na forma lipossomal, sem associações, não demonstraram uma atividade antifúngica clinicamente relevante, visto que apresentaram IC₅₀ com valores elevados em relação ao controle (Fluconazol), como por exemplo, o Trans- Cariofileno (L) que chegou até 65249,81 $\mu\text{g/mL}$ frente a CT.

Tabela 4 – IC₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) (em Média $\pm$ Erro padrão da média) dos sesquiterpenos nas formas livre, lipossomal e controles frente a linhagens de *Candida*.

IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) dos sesquiterpenos livres, na forma lipossomal e controles			
SUBSTÂNCIAS	CA INCQS 40006	CT INCQS 40042	CK INCQS 40095
Bisabolol	4546 $\pm$ 97	105717 $\pm$ 26254	4654 $\pm$ 98
Bisabolol (L)	3914 $\pm$ 97	10011 $\pm$ 1056	2601 $\pm$ 98
Farnesol	12572 $\pm$ 923	27457 $\pm$ 2667	31318 $\pm$ 5134
Farnesol (L)	4057 $\pm$ 125	15286 $\pm$ 1419	6296 $\pm$ 722
Cariofileno	28463 $\pm$ 3449	32483 $\pm$ 9552	26460 $\pm$ 6714
Cariofileno (L)	56324 $\pm$ 9033	65249 $\pm$ 20452	28024 $\pm$ 3676
Nerolidol	10704 $\pm$ 1135	25336 $\pm$ 4927	15408 $\pm$ 1051
Nerolidol (L)	16000 $\pm$ 2462	12777 $\pm$ 1112	47566 $\pm$ 12098
Fluconazol (controle)	55,98 $\pm$ 12.11	1168 $\pm$ 118	35,68 $\pm$ 1.74
Lipossomas (controle)	13512 $\pm$ 1369	23491 $\pm$ 823	39278 $\pm$ 7467

IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) dos sesquiterpenos livres, na forma lipossomal e controles associados ao Fluconazol			
SUBSTÂNCIAS	CA INCQS 40006	CT INCQS 40042	CK INCQS 40095
Bisabolol (L) + FCZ	2,59 $\pm$ 0,07	2,5 $\pm$ 0,01	70,90 $\pm$ 5,43
Farnesol (L) + FCZ	2,52 $\pm$ 0,02	2,48 $\pm$ 0,01	67,68 $\pm$ 1,17
Cariofileno (L) + FCZ	130 $\pm$ 38	798 $\pm$ 77	43,08 $\pm$ 3,55
Nerolidol (L) + FCZ	2.56 $\pm$ 0.03	2.70 $\pm$ 0.06	72.69 $\pm$ 5.62
Bisabolol + FCZ	1142 $\pm$ 47	925 $\pm$ 169	37,09 $\pm$ 5,36

Farnesol + FCZ	905 ± 158	1297 ± 113	42,60 ± 4,11
Cariofileno+ FCZ	554 ± 103	891 ± 166	34,40 ± 1,20
Nerolidol + FCZ	819 ± 83	1166 ± 113	41,93 ± 4,85
Fluconazol (controle)	55,98 ± 12,11	1168 ± 118	35,68 ± 1,74
Lipossomas (controle) + FCZ	788 ± 142	1737 ± 164	61,33 ± 6,75

(L): lipossomal; CA: *Candida albicans*; CT: *Candida tropicalis*; CK: *Candida krusei*; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, FCZ: Fluconazol.

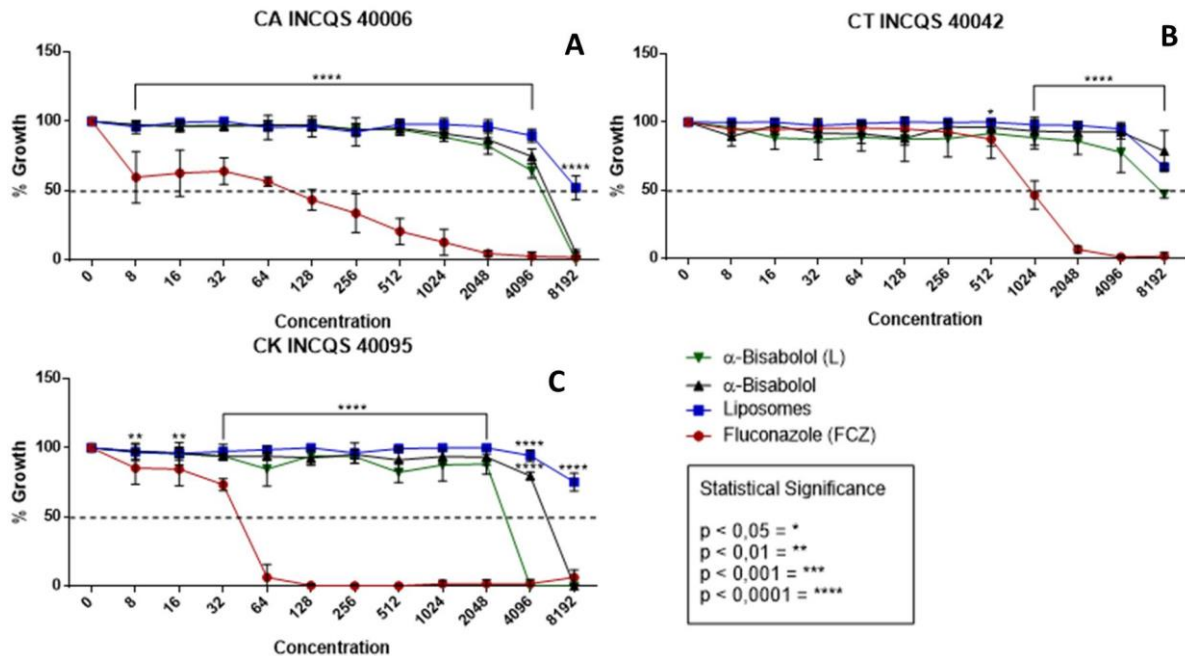
No entanto, é importante perceber que ao associar os compostos lipossomais com o Fluconazol, fazendo com que ambos atuem juntos, todos conseguiram potencializar o efeito do antifúngico, com exceção do Trans-Cariofileno (L) frente a CA e CK, reduzindo consideravelmente os valores das IC₅₀, onde atingiu o menor valor de 2,48 µg/mL (Farnesol (L)), reduzindo 500 vezes a concentração de efeito comparada com a do controle medicamentoso, frente a cepa de *Candida tropicalis*.

Atuando semelhante ao Farnesol, o Bisabolol (L) e o Nerolidol (L) potencializaram a ação do FCZ frente a CA e CT, esse dado é interessante, visto que as concentrações dos produtos estão geralmente associadas à citotoxicidade celular.

5.3 ANÁLISE DA CURVA DE VIABILIDADE CELULAR DE *CANDIDA* SPP. SOB AÇÃO DOS SESQUITERPENOS

Na Figura 8, a seguir, temos a atuação do α - bisabolol em sua forma livre e lipossomal frente às cepas de *Candida*. Na imagem é perceptível, através dos valores das concentrações que a atuação dos compostos isoladamente mostrou uma atividade antifúngica irrisória, atingindo concentrações elevadas para inibirem a formação das colônias, esse efeito foi estatisticamente relevante, comparado com a melhor atuação do controle (FCZ). O controle dos lipossomas, por serem apenas as vesículas sem nenhum fármaco incorporado, não apresentou efeito de inibição frente a todas as cepas, como esperado.

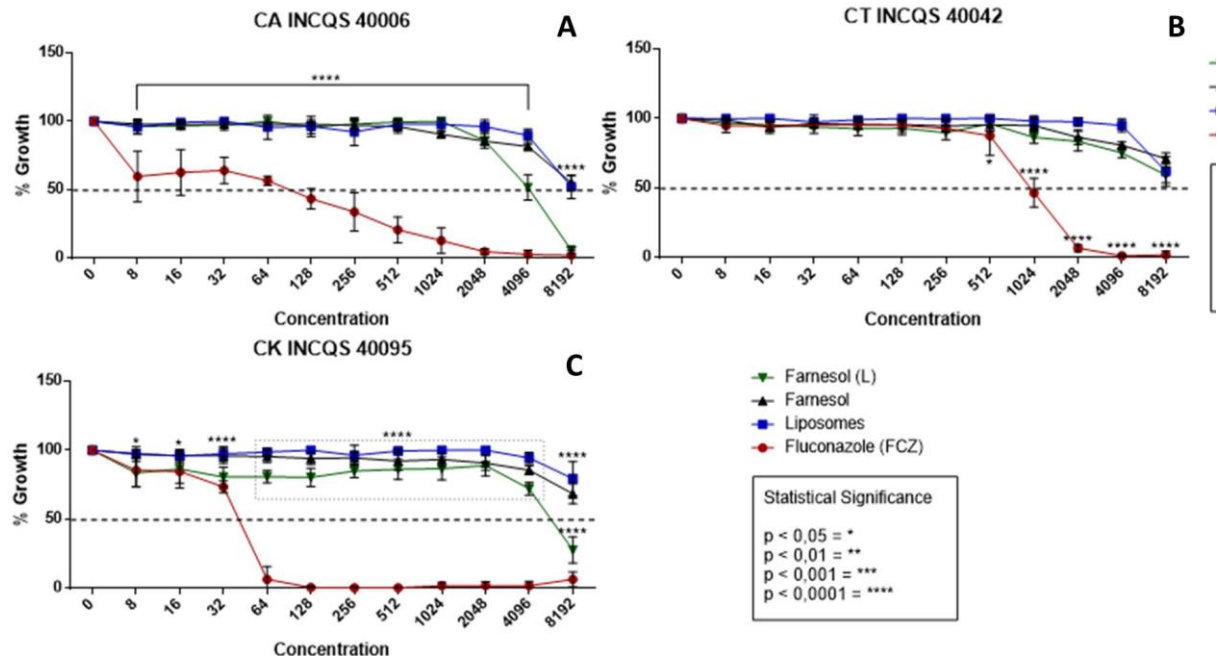
Figura 8 – Curva de viabilidade celular de *Candida* spp. sob ação do α - bisabolol livre, na forma lipossomal, lipossomas (controle) e fluconazol (controle).



Fonte: autoral, 2021

Analisando a curva de viabilidade celular dos fungos em relação ao Farnesol livre, Figura 9, na forma lipossomal, controle dos lipossomas e ao FCZ em suas diferentes concentrações, que mostra a ação dos compostos atuando isoladamente frente às cepas. É notório que os compostos testados apresentaram um potencial de inibição bastante reduzido, atingindo concentrações elevadas para inibirem a formação das colônias, esse efeito foi estatisticamente relevante, comparado com a melhor atuação do controle (FCZ), podendo ser visto nas concentrações de 8 a 4096 µg/mL (Fig. 9A), 512 a 8142 µg/mL (Fig. 9B) e 64 a 4096 µg/mL (Fig. 9C).

Figura 9 – Curva de viabilidade celular de *Candida* spp. sob ação do farnesol livre, na forma lipossomal, lipossomas (controle) e fluconazol (controle).

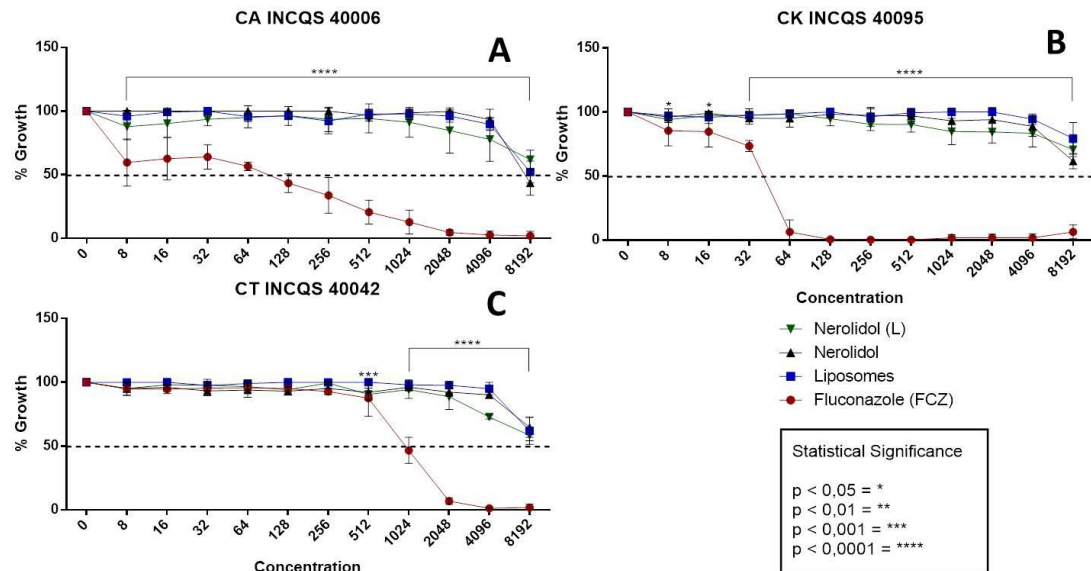


Fonte: autoral, 2021

Analisando a curva de viabilidade celular dos fungos que mostra a ação dos compostos (Nerolidol livre, na forma lipossomal, controle dos lipossomas e ao FCZ) na inibição fúngica, na Figura 10, frente às cepas do gênero *Candida*.

Nos gráficos a atuação dos compostos foram semelhantes, todos se mostraram com fraca atividade antifúngica em relação ao controle (FCZ) onde apresentou inibição com valores elevados (Fig 10A e Fig 10B) pra CA e CT (2048 µg/mL) e frente a CK inibiu 100% do crescimento com 64 µg/mL (Fig 10C).

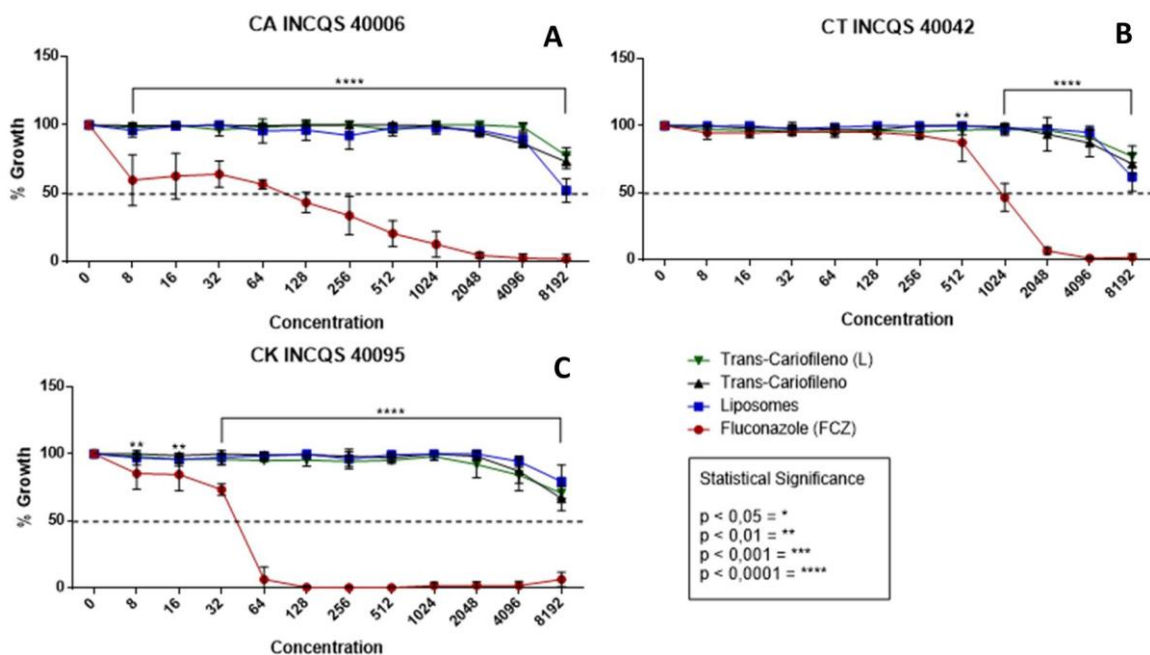
Figura 10 – Curva de viabilidade celular de *Candida* spp. sob ação do nerolidol livre, na forma lipossomal, lipossomas (controle) e fluconazol (controle).



Fonte: autoral, 2021

Na Figura 11 a seguir temos a atuação do Trans- cariofileno, que semelhantemente aos sesquiterpenos anteriores demonstrou uma fraca atividade antifúngica, com concentrações elevadas e até mesmo com essas concentrações não conseguiram nem atingir a inibição de 50%.

Figura 11 – Curva de viabilidade celular de *Candida* spp. sob ação do Trans-cariofileno livre, na forma lipossomal, lipossomas (controle) e fluconazol (controle).



Fonte: autoral, 2021

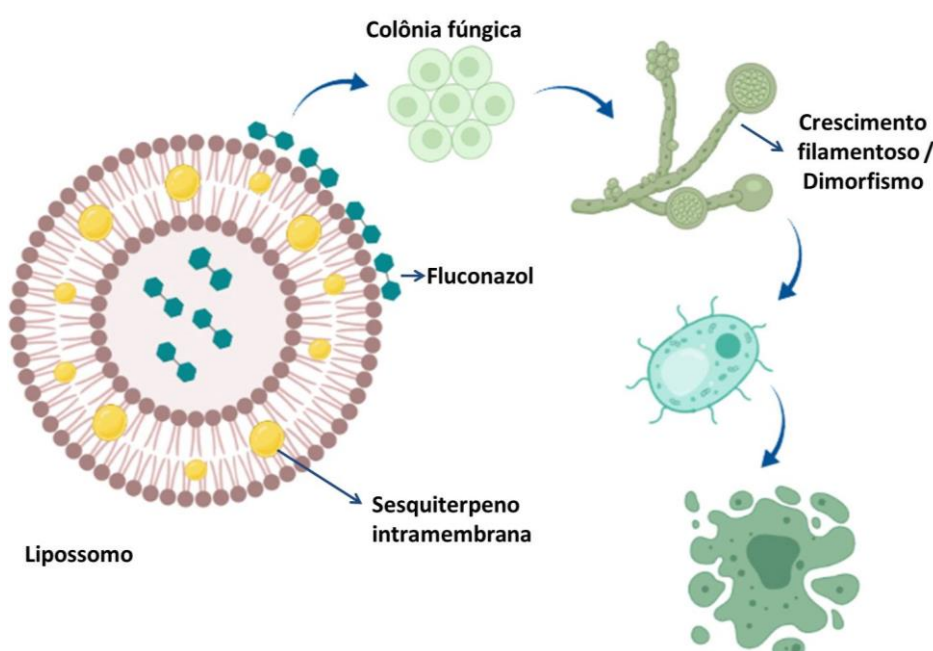
5.4 ANÁLISE DA CURVA DE VIABILIDADE CELULAR DO EFEITO MODIFICADOR DA AÇÃO DO FLUCONAZOL

Os resultados a seguir revelam um efeito estatisticamente relevante da associação dos compostos lipossomais juntamente com o FCZ. Vale ressaltar que todos os sesquiterpenos foram utilizados em suas concentrações subinibitórias, ou seja, sua Concentração Matriz - CM dividida por 16, para que dessa forma o produto natural não consiga sozinho, inibir as leveduras, mas que nesta concentração potencializasse a atuação do fluconazol.

Na Figura 12 temos uma ilustração para elucidar a possível atuação dos compostos em associação, possivelmente a estrutura lipossomal adsorveu o fármaco (FCZ) em sua superfície ou englobou a solução de fluconazol/ água na parte interna do lipossomo tendo sua distribuição e efeito prolongado.

Esse efeito foi significativo nos gráficos da associação da conjugação dos sesquiterpenos encapsulados associados ao FCZ, somado aos valores baixos da IC_{50} , dado relevante quando consideramos a redução da concentração de fármaco utilizada, bem menor que o controle do fármaco atuando sozinho, podendo reduzir consideravelmente a toxicidade celular.

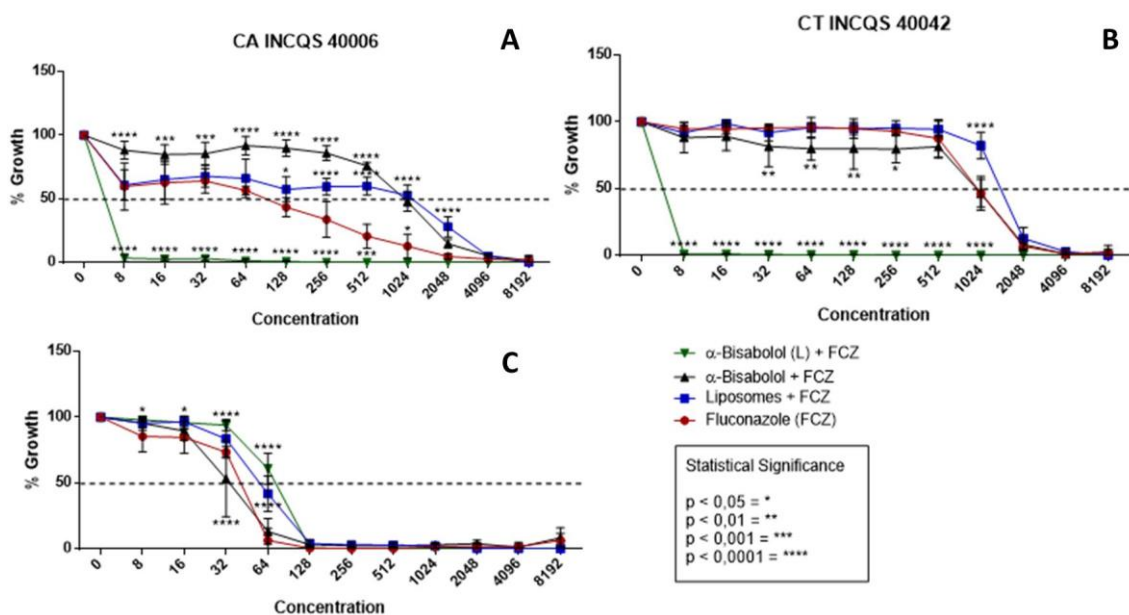
Figura 12 – Ilustração do efeito dos compostos lipossomais nas colônias fúngicas



Fonte: autoral, 2021

Com isso na Figura 13, temos um efeito sinérgico, visto que, o α - bisabolol e FCZ conseguiram inibir 100% da formação de colônias a partir da concentração 8 $\mu\text{g/mL}$ frente a CA e CT, sendo estas concentrações clinicamente relevantes. No entanto, frente a *C. krusei* a atuação foi indiferente para os compostos testados.

Figura 13 – Curva de viabilidade celular de *Candida* spp. sob ação do α - bisabolol livre, na forma lipossomal, lipossomas (controle) associados ao Fluconazol.

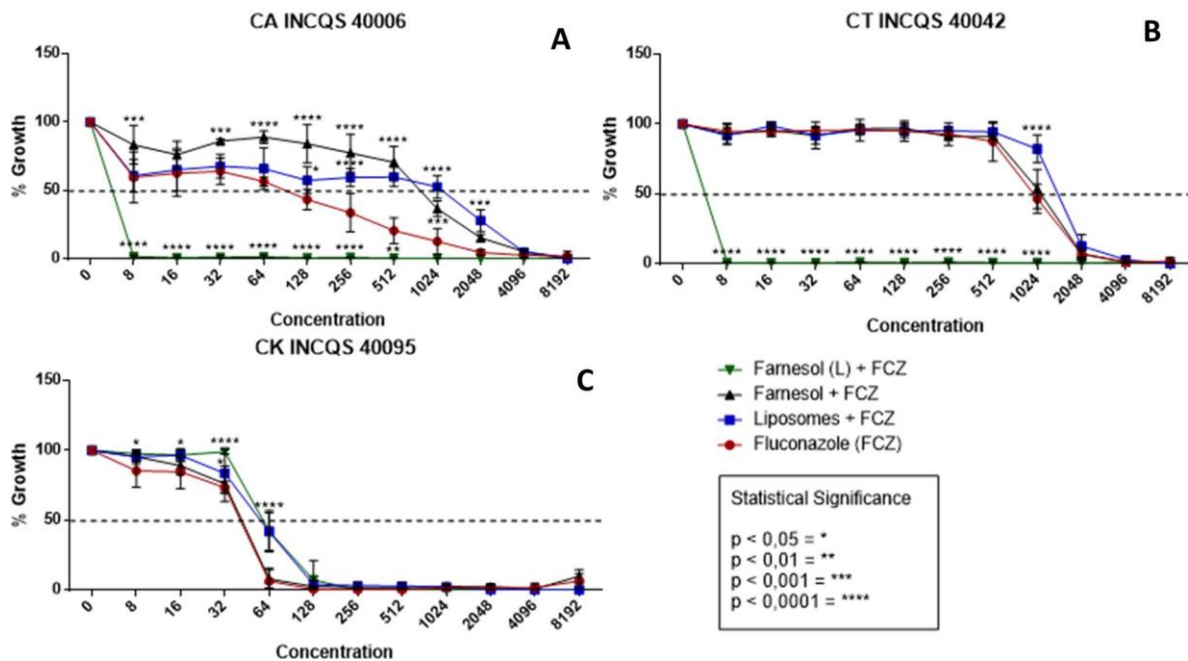


Fonte: autoral, 2021

Na Figura 14 temos a curva de viabilidade celular do Farnesol livre, na forma lipossomal e o controle dos lipossomas associados ao Fluconazol frente às linhagens de *Candida*. Nesses gráficos a atuação dos compostos juntamente com o fluconazol foi significativamente relevante frente às cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis*, (Fig 14A e Fig 14B) demonstrando um efeito sinérgico, visto que, conseguiram inibir 100% da formação de colônias a partir da concentração 8 $\mu\text{g/mL}$, sendo essa uma concentração clinicamente relevante. No entanto, frente a *C. krusei* a atuação foi indiferente para os compostos testados.

O fato que chama a atenção é que o mesmo produto Farnesol, sem estar na forma lipossomal, obteve um efeito antagônico contra CA e CT, no entanto, quando incorporado a lipossomas seu efeito é sinérgico, onde possivelmente formaram um complexo lipossomal farnesol e fluconazol, tendo sua distribuição controlada e constante, gerando um possível dano na membrana fúngica e impedindo o crescimento celular.

Figura 14 – Curva de viabilidade celular de *Candida* spp. sob ação do farnesol livre, na forma lipossomal, lipossomas (controle) associados ao Fluconazol.

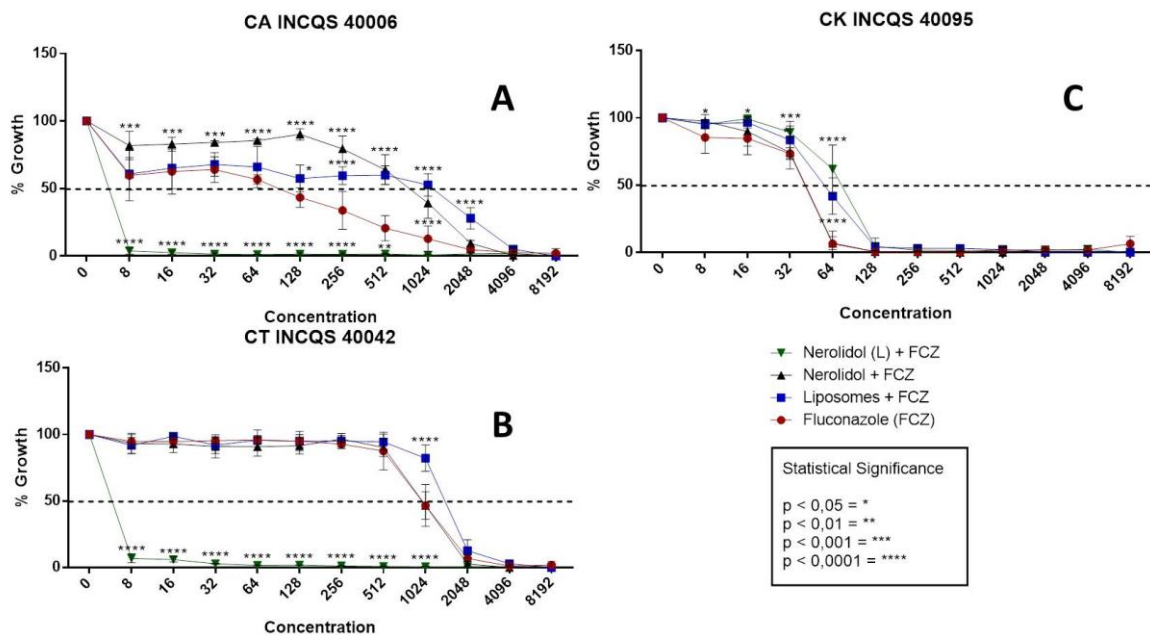


Fonte: autoral, 2021

Nos gráficos a seguir temos a atuação do nerolidol juntamente com o fluconazol, onde revelou um efeito significativamente relevante frente às cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis*, (Fig 15A e Fig 15B), demonstrando uma ação potencializadora, visto que, conseguiram inibir 100% da formação de colônias a partir da concentração 16 e 32 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, sendo estas concentrações clinicamente relevantes. No entanto, frente a *C. krusei* a atuação foi indiferente para os compostos testados.

Um fato peculiar nesses gráficos é que o mesmo produto nerolidol (Fig. 15), sem estar na forma lipossomal, apresentou um efeito contrário frente a CA e CT, porém, estando encapsulado em lipossomas seu efeito é sinérgico, ou seja, presumivelmente originaram um composto lipossomal nerolidol e fluconazol, com dispersão controlada e constante, causando um possível dano na membrana e impedindo o crescimento fúngico.

Figura 15 – Curva de viabilidade celular de *Candida* spp. sob ação do nerolidol livre, na forma lipossomal, lipossomas (controle) associados ao Fluconazol.

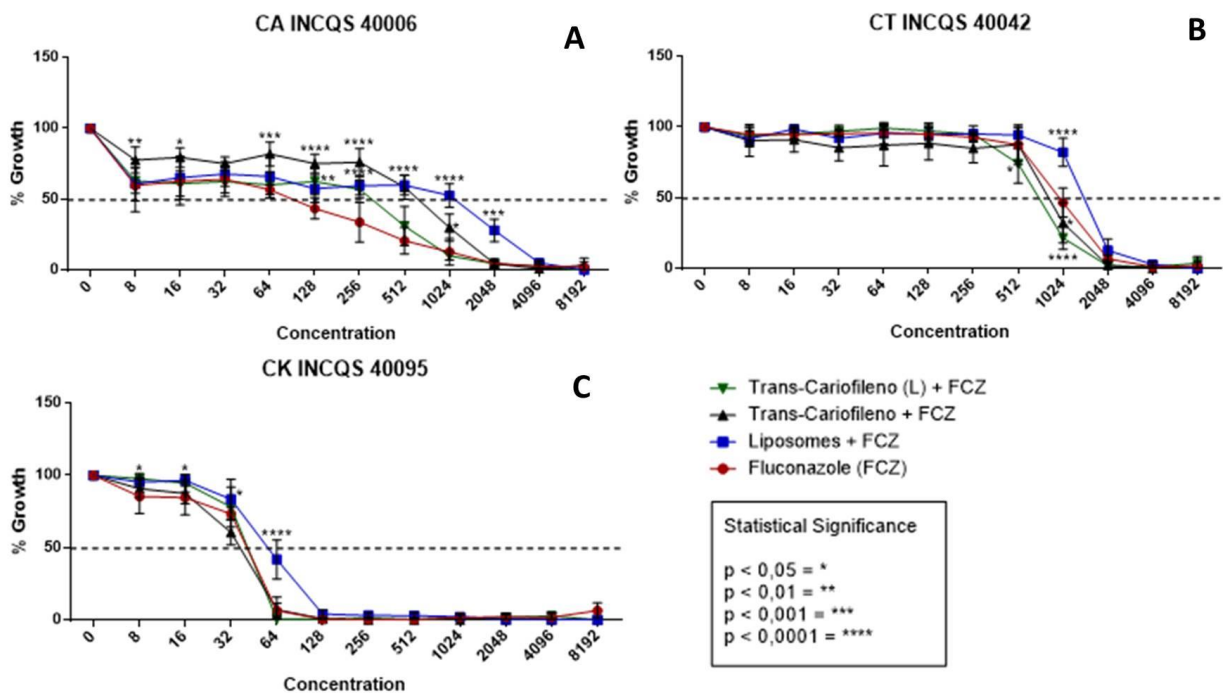


Fonte: autoral, 2021

Na Figura 16 temos os resultados da curva de viabilidade celular referentes às seguintes associações: TC em sua forma livre e lipossomal juntamente com o Fluconazol. Os gráficos juntamente com as altas concentrações das IC_{50} revelam que os compostos testados, não demonstraram atividade antifúngica significativa mesmo em associação com o antifúngico.

A atuação dos compostos juntamente com o fluconazol que teve um efeito semelhante ao controle foram o TC e TC (L) (64 μ g/mL) frente a CK, (Fig 16C), demonstrando um efeito potencializador, no entanto não significativo, visto que, o controle apresentou o mesmo efeito antifúngico.

Figura 16 – Curva de viabilidade celular de *Candida* spp. sob ação do Trans- cariofileno livre, na forma lipossomal, lipossomas (controle) associados ao Fluconazol.



Fonte: autoral, 2021

5.5 EFEITO DOS COMPOSTOS NA MORFOLOGIA FÚNGICA

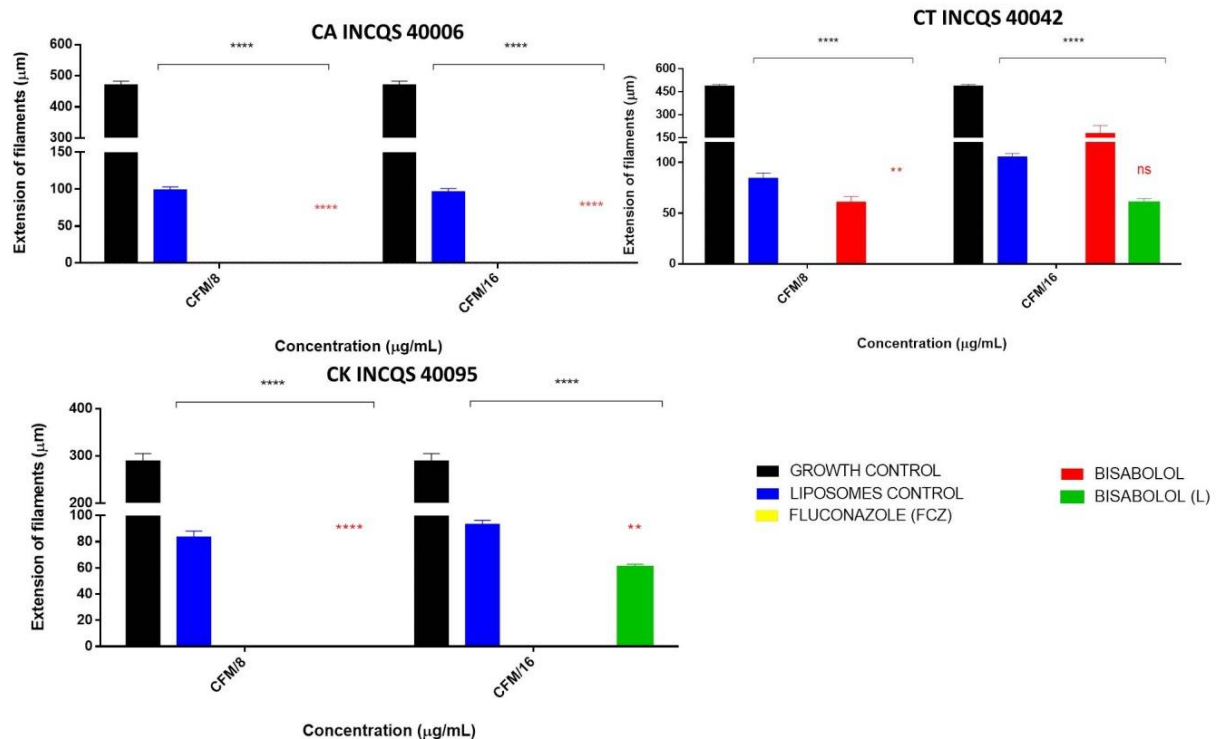
Nesta seção temos os dados referentes à atividade dos compostos sobre um dos mecanismos de invasão de tecidos e de virulência fúngica, que é o dimorfismo fúngico. As concentrações utilizadas foram: CM/8- 2048 µg/mL e CM/16- 1024 µg/mL, a partir dos dados visualizados nos gráficos, pode-se inferir que a atuação do Fluconazol no impedimento de formação de estruturas filamentosas foi significativa nas duas concentrações e em todas as cepas testadas, pois não houve crescimento em nenhum momento, por isso não há presença da cor amarela indicativa de dimorfismo fúngico na presença do FCZ.

O Bisabolol livre e lipossomal também conseguiram restringir 100% do dimorfismo fúngico, em ambas as concentrações, frente a *C. albicans* (Fig 17), frente a CT o Bisabolol isolado não apresentou um efeito inibitório significativo, no entanto frente a cepa CK inibiu 100% no crescimento filamentosos em ambas concentrações, sendo este efeito estatisticamente relevante. Ademais, esta cepa apresenta resistência intrínseca ao FCZ, sendo um resultado importante para busca de novos compostos antifúngicos.

O Bisabolol na forma lipossomal frente a CT e a CK apresentou atividade importante

em sua concentração mais elevada, impedindo totalmente o dimorfismo fúngico em ambas cepas, entretanto na concentração mais baixa frente a essas cepas o efeito não foi significativo.

Figura 17 – Efeito no dimorfismo fúngico do α - bisabolol livre, na forma lipossomal, Lipossomas (controle) e Fluconazol (controle) isolado frente a linhagens de *Candida*.

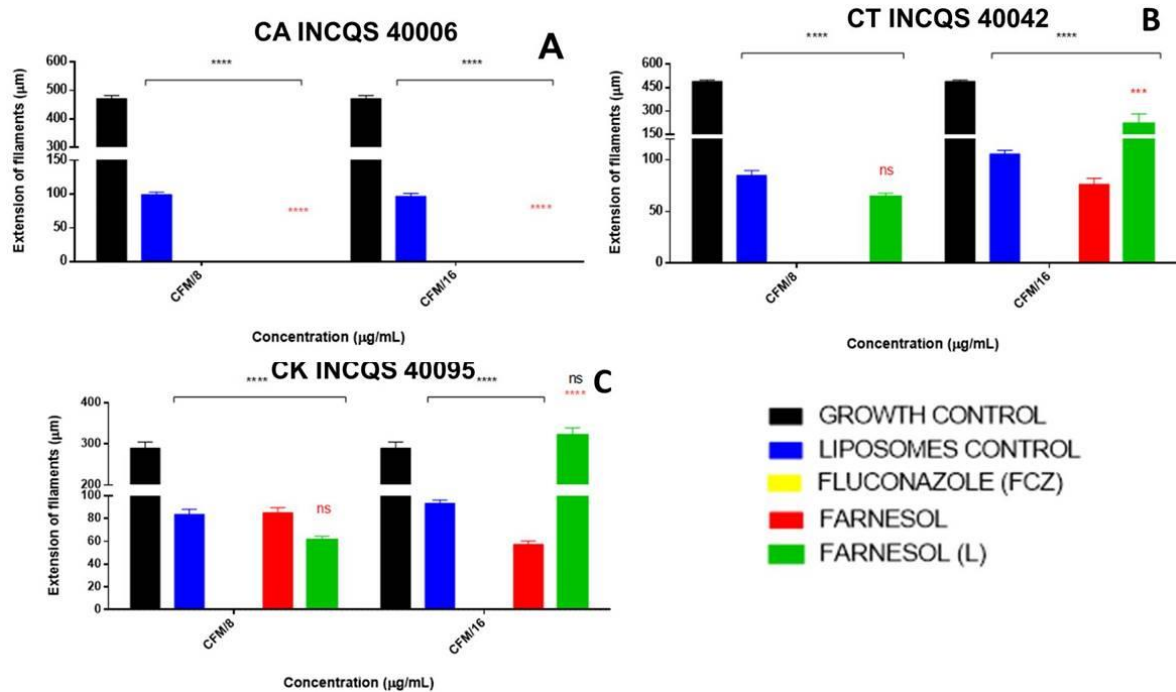


(L): lipossomal; CA: *Candida albicans*; CT: *Candida tropicalis*; CK: *Candida krusei*; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, FCZ: Fluconazole; CM/8- 2048 μg/mL e CM/16- 1024 μg/mL, Fonte: autoral, 2021.

O Farnesol livre e lipossomal também conseguiram restringir 100% do dimorfismo fúngico, em ambas concentrações, frente a *C. albicans* (Fig 18), esse resultado era esperado, devido ao Farnesol ser uma molécula de *quorum sensing* (QS), produzida por essa espécie e atuar como fator na regulação do crescimento hifal.

Na forma isolada, o farnesol livre na concentração CM/8 frente à CT inibiu 100% do dimorfismo, no entanto na menor concentração CM/16 não foi eficaz como o fluconazol, sendo sua atuação estatisticamente relevante. Na forma lipossomal, na referida concentração, não apresentou um efeito anti-dimorfismo relevante, sendo sua atuação não significativa.

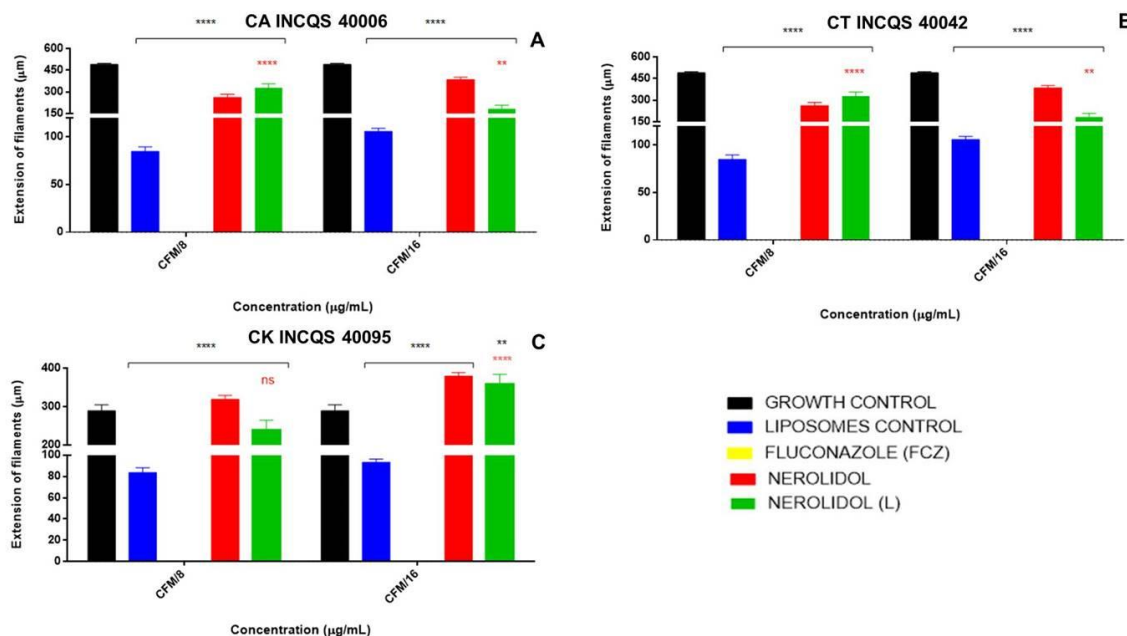
Figura 18 – Efeito no dimorfismo fúngico do Farnesol livre, na forma lipossomal, Lipossomas (controle) e Fluconazol (controle) isolado frente a linhagens de *Candida*.



(L): lipossomal; CA: *Candida albicans*; CT: *Candida tropicalis*; CK: *Candida krusei*; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, FCZ: Fluconazole; CM/8- 2048 μg/mL e CM/16- 1024 μg/mL, Fonte: autoral, 2021.

O nerolidol livre e lipossomal não apresentaram potencial de inibição filamentosa em nenhuma das concentrações das cepas testadas (Fig 19), ademais, frente a cepa CK, o nerolidol livre e lipossomal, pareceram estimular a virulência fúngica, visto que as hifas se apresentaram mais extensas que o próprio controle de crescimento fúngico.

Figura 19 – Efeito no dimorfismo fúngico do Nerolidol livre, na forma lipossomal, Lipossomas (controle) e Fluconazol (controle) isolado frente a linhagens de *Candida*.

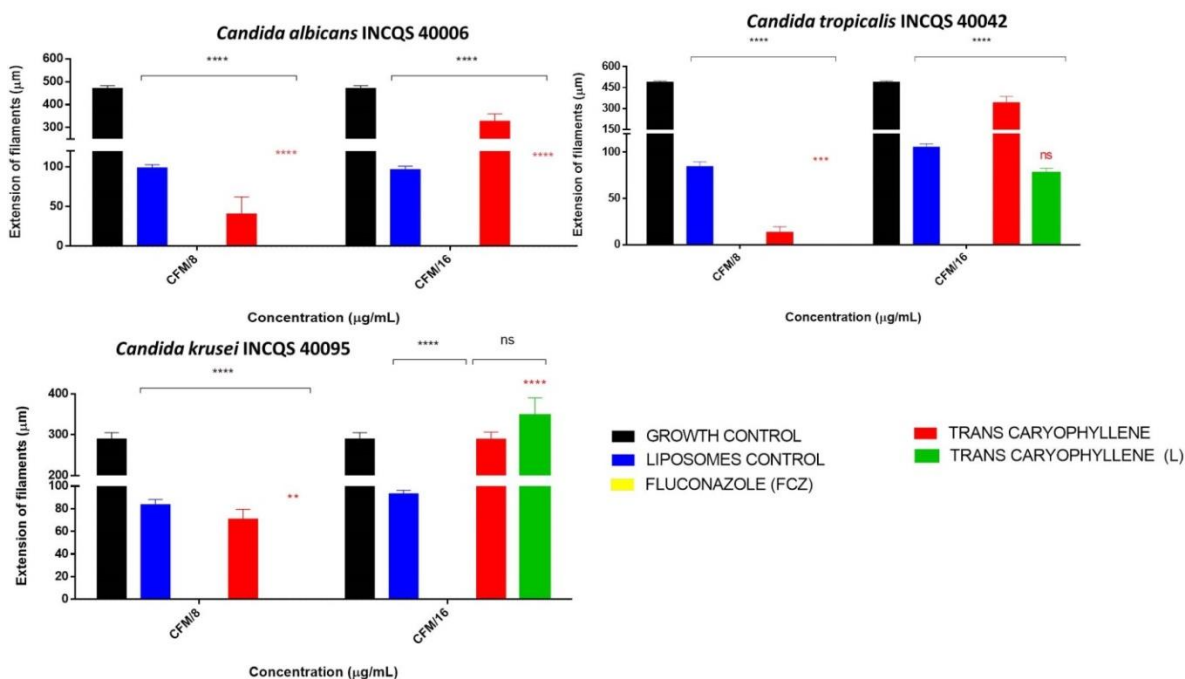


(L): lipossomal; CA: *Candida albicans*; CT: *Candida tropicalis*; CK: *Candida krusei*; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, FCZ: Fluconazole; CM/8- 2048 μg/mL e CM/16- 1024 μg/mL, Fonte: autoral, 2021.

O TC livre e lipossomal também conseguiram restringir 100% do dimorfismo fúngico, em ambas concentrações, frente a *C. albicans* (Fig 20), frente a *C. tropicalis*, enquanto o TC isolado não apresentou um efeito inibitório significativo. No entanto, frente a cepa *C. krusei* TC lipossomal inibiu consideravelmente o crescimento filamentososo na maior concentração, sendo este efeito estatisticamente relevante, visto que, esta cepa apresenta resistência intrínseca ao FCZ, sendo um resultado importante para busca de novos compostos antifúngicos.

O TC na forma lipossomal frente a CT e a CK apresentou atividade importante em sua concentração mais elevada, impedindo totalmente o dimorfismo fúngico em ambas cepas, entretanto na concentração mais baixa frente a essas cepas o efeito não foi significativo.

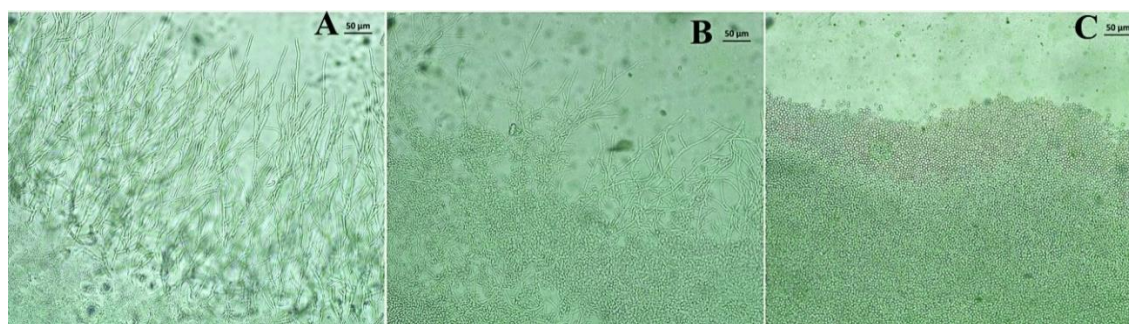
Figura 20 – Efeito no dimorfismo fúngico do Trans- cariofileno livre, na forma lipossomal, Lipossomas (controle) e Fluconazol (controle) isolado frente a linhagens de *Candida*.



(L): lipossomal; CA: *Candida albicans*; CT: *Candida tropicalis*; CK: *Candida krusei*; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, FCZ: Fluconazole; CM/8- 2048 µg/mL e CM/16- 1024 µg/mL, Fonte: autoral, 2021.

A Figura 21 exemplifica as imagens da microscopia fúngica e atuação dos compostos em concentrações diferentes, sendo possível a visualização das estruturas filamentosas no controle de crescimento, a inibição parcial e total das estruturas.

Figura 21 – Imagens de microscopia óptica demonstrando os efeitos das diferentes concentrações autando no dimorfismo fúngico.



(A) Controle de crescimento; (B) Sesquiterpeno (Farnesol) (CM/8); (C) Fluconazol CM/8, Fonte: autoral, 2021.

6 DISCUSSÃO

A caracterização dos lipossomas é um ponto chave para a estabilização das vesículas, sobre isso, temos que, um parâmetro físico-químico de extrema importância é o potencial zeta, visto que, ele determina a estabilidade das nanossuspensões de qualquer tipo, como lipossomas. A força de repulsão entre lipossomas com cargas elétricas semelhantes propicia uma maior facilidade de redispersão dessas partículas e retarda sua agregação. Diante disso, valores de potenciais zeta com extremos positivos ou negativos são preferidos (PATIL *et al.*, 2007; PUTTIPIATKHACHORN *et al.*, 2001).

Isso significa que um potencial zeta com valor mínimo de ± 20 mV é esperado para garantir a combinação de estabilidade eletrostática e estérica de uma nanossuspensão (HONARY; ZAHIR, 2013). Em nosso estudo os compostos lipossomais apresentaram potenciais zeta com valores dentro do preconizado para evitar a agregação lipossômica.

O tamanho médio do nerolidol lipossomal foi de 132,3 nm, esse dado está de acordo com o valor desejado (aproximadamente 100 nm) para lipossomas preparados por pesquisadores da área (PONS; FORADA; ESTELRICH, 1993; SEBAALY; GREIGERGES; AGUSTI; FESSI; CHARCOSSET, 2015a, 2015b). A variação dos tamanhos das vesículas que foram formadas nesse estudo pode ser justificada, pelo fato do nerolidol induzir modificações no arranjo de lipídios, consequentemente formando nanoestruturados maiores (AZZI *et al.*, 2018).

O avanço e crescente aumento da incidência de infecções fúngicas oportunistas em pacientes imunodreprimidos tem chamado a atenção. Visto que, as semelhanças celulares e vias bioquímicas intracelulares entre as células eucarióticas, dificultam o tratamento dessas infecções, a descoberta de novos agentes antifúngicos é uma questão imprescindível (KRISTAN; RIZNER, 2012).

A utilização de compostos naturais para o controle de doenças fúngicas é considerada uma alternativa tradicional ao uso medicamentos sintético fungicida (HOLLIS; JONES, 2009). Plantas aromáticas, seus óleos essenciais e seus compostos são comumente usados desde a antiguidade por suas propriedades biológicas (bactericidas, fungicida, virucida, antiparasitária e inseticida), assim como para fins cosméticos e medicinais (EDRIS, 2007; BAKKALI *et al.*, 2008).

No presente estudo utilizamos quatro sesquiterpenos com atividades biológicas conhecidas, dentre elas está o potencial contra as infecções por *Candida*, que já foi relatado anteriormente (DALLEAU *et al.*, 2008, MARTÍNEZ *et al.*, 2014), além disso, pesquisas

afirmam que os sesquiterpenos podem atuar inibindo a formação de hifas de *C. albicans* (XIE *et al.*, 2015), fato que corrobora com os resultados obtidos no presente trabalho, onde sesquiterpenos como farnesol e bisabolol inibiram totalmente estruturas filamentosas de *C. albicans*.

O bisabolol é conhecido por ter propriedades anti-inflamatórias, antiespasmódicas e antimutagênicas (HOLUB; SORM, 1955; GOMERS- CARNEIRO *et al.*, 2005) e propriedades antimicrobianas (PAULI; SCHLCHER, 2009).

A ausência de pesquisas com sesquiterpenos encapsulados em nanoestruturas com atividade antifúngica dificultou a discussão do estudo, no entanto, encontramos pesquisas com os mesmos sesquiterpenos, porém com metodologias e outros tipos de espécies fúngicas. No trabalho de De Lucca *et al.* (2011) ao testarem o bisabolol em fungos filamentosos, obtiveram uma inibição do crescimento de todos isolados testados em 72- 120 h, chegando a valores de doses inibitórias de até 2–4 µg / mL.

Em relação ao dano celular e inibição do crescimento fúngico, visto no estudo atual, algumas pesquisas anteriores têm demonstrado que o bisabolol provoca a apoptose celular, pela redução do consumo de oxigênio em células de glioma humano e de camundongos, devido a alterações na estrutura e função da permeabilidade mitocondrial no poro de transição (CAVALIERI *et al.*, 2009).

Um estudo anterior, semelhante ao presente estudo, foi uma avaliação *in vitro* de lipossomas contendo o óleo essencial de *Zanthoxylum tingoassuiba* que tem como componente majoritário (70%) o bisabolol, mostrou atividade antimicrobiana significativa, por difusão em disco, contra bactérias gram positivas e fungos dermatófitos. Corroborando com os nossos resultados, os lipossomas carregados com o óleo essencial rico em bisabolol mostraram esfericidade adequada e distribuição de tamanho mais estreita do que lipossomas vazios (DETONI *et al.*, 2009).

O farnesol é composto comumente encontrado em óleos essenciais e se destaca por apresentar atividades antimicrobianas. Temos como exemplo o óleo essencial de *Tetradenia riparia*, onde o farnesol é um dos compostos majoritário, cujo potencial contra microrganismos foi evidenciado, dentre eles as bactérias cariogênicas (DE MELO *et al.*, 2015).

Atividades antifúngica do farnesol já foi evidenciada também em outros estudos, tendo comprovada eficácia frente a fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus*, *Paracoccidioides* ou *Cryptococcus* (SEMIGHINI *et al.*, 2006; DERENGOWSKI *et al.*, 2009; CORDEIRO RDE

et al., 2012), sendo considerado como promissor para a contenção de vários microrganismos (DERENGOWSKI *et al.*, 2009; DIZOVÁ; BUJDAKOVA, 2017), esses fatos são importantes, pois no presente estudo o farnesol mostrou-se como inibidor de virulência e potencializou o efeito do fluconazol.

Em relação à inibição do dimorfismo fúngico, assim como nos nossos resultados, onde o farnesol inibiu os filamentos fúngicos, o estudo de Hisajima *et al.* (2008) identificou o potencial do farnesol utilizando-o no tratamento da candidíase oral por *C. albicans* em camundongos, sendo evidenciado por resultados histológicos que o farnesol reduziu a formação de colônias e micélios na língua dos animais, assim como nas fezes, rins e fígado destes animais.

Não foram encontrados estudos com associação dos sesquiterpenos encapsulados em lipossomas associados ao fluconazol, além disso, existem poucos trabalhos envolvendo aplicações do farnesol na nanotecnologia com atividades antifúngicas, porém um estudo recente de Fernandes Costa *et al.* (2019) mostrou a eficiência de nanopartículas de quitosana de miconazol associado com farnesol, bem como farnesol sozinho, para tratar candidíase vulvovaginal em murinos, sendo esse efeito inibidor semelhante ao encontrado na associação dos sesquiterpeno ao FCZ no presente estudo.

Por outro lado, Navarathna *et al.* (2007) afirmaram que o farnesol pode aumentar a virulência de outras espécies de *Candida* e aumentar a mortalidade em um modelo murino de doença. Novos estudos com outros modelos experimentais, incluindo cateteres pré-tratados e outros dispositivos, são necessários para esclarecer esse problema.

Outro estudo revelou uma possível justificativa para a morte celular fúngica pelo composto em questão, através de um perfil de expressão global de proteínas após o tratamento utilizando farnesol, em leveduras de *Candida* spp. evidenciou dano mitocondrial, devido ao acúmulo de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), consequentemente ativando o ciclo da caspase seguido de apoptose celular (SHIRTLIFF *et al.*, 2009).

As relações sinérgicas entre farnesol lipossomal e fluconazol no presente estudo, semelhantemente foram encontradas nos estudos de Yu *et al.* (2012), Cordeiro *et al.* (2013) e De Cremer *et al.* (2015), onde o farnesol também atua sinergicamente com fármacos antifúngicos. Além desses, um efeito sinérgico *in vitro* entre farnesol e vários outros compostos antifúngicos, testado frente à formação de biofilmes, foram reportados tendo como referência cepas de *C. albicans* SC5314 (KATRAGKOU *et al.*, 2015). Ainda reforçando as interações sinérgicas do composto em questão, Bozó e colaboradores (2016) verificaram a associação de farnesol e Fluconazol contra biofilmes de cepas suscetíveis e resistentes de

Candida sp. e observou um efeito sinérgico entre eles, sendo o efeito de potencialização do fármaco semelhante ao presente estudo.

No tocante a atuação em outras espécies, outros trabalhos anteriores também comprovam que o farnesol não sensibiliza apenas *C. albicans*, mas possui uma pluralidade de efeitos inibitórios em outras espécies de fungos, coibindo o dimorfismo e o crescimento hifal de espécies de *Candida* não *albicans* (JABRA-RIZK *et al.*, 2006; HENRIQUES *et al.*, 2007; ROSSIGNOL *et al.*, 2007; WEBER *et al.*, 2010; MONTEIRO *et al.*, 2017; POLKE *et al.*, 2018), indo em consonância com o atual estudo.

Portanto, a utilização do farnesol como composto terapêutico tem sido aconselhada (HORNBY *et al.*, 2001; CORDEIRO *et al.*, 2019). Na pesquisa de Augustín *et al.* (2019) ficou comprovada a eficácia do farnesol frente a biofilmes de *C. tropicalis*, com claro efeito inibitório nas concentrações de 0.6 mmol^{-1} em associação com natamicina a $0,01 \text{ mmol}^{-1}$ verificando-se que o tratamento interrompeu fortemente a arquitetura do biofilme.

No estudo de Fleischmann, Broeckling e Lyons (2017) utilizaram o farnesol (1mg/ml) para avaliar a inibição do dimorfismo fúngico em cepas de *C. krusei*, eles verificaram por três dias a atuação do composto, para isso inseriu estrias fúngicas paralelas com distâncias diferentes (0,5, 1,0 e 1,5 cm) sendo que no primeiro dia a inibição foi total em todas as distâncias, no segundo dia houve um crescimento moderado nas estrias mais próximas e no terceiro dia houve crescimento em todas as placas, concluindo que a distância entre as estrias realmente fizeram a diferença quanto ao tempo e a demora em que micélios aparecessem.

Além desse sesquiterpeno, outras pesquisas revelam a ação do Nerolidol na potencialização de fármacos, promovendo uma elevação da capacidade de permeabilidade percutânea *in vitro* de medicamentos como: cloridrato de nicardipina, hidrocortisona, carbamazepina e tamoxifeno (EL-KATTAN *et al.*, 2001), bem como diclofenaco de sódio (NOKHODCHI *et al.*, 2007), assim como nesse estudo o nerolidol na forma lipossomal potencializou o efeito do fluconazol.

A atividade antifúngica do nerolidol foi alvo de estudos anteriores onde pode ser relatado uma forte atividade antifúngica contra *C. albicans* (ALVIANO *et al.*, 2005; KHAN *et al.*, 2010; HSU *et al.*, 2013; TAO *et al.*, 2013), mas, curiosamente, no trabalho de Curvelo *et al.* (2014) o nerolidol pareceu ser mais eficaz contra as estirpes susceptíveis de *C. albicans* em comparação com as resistentes, além disso, ao testar a mistura cis, trans-nerolidol adquirida comercialmente e o mesmo composto extraído das folhas, puderam perceber que o composto comercial, foi capaz de reduzir o crescimento fúngico a uma concentração maior

que o óleo essencial das folhas, apresentando uma atividade mais baixa em todas as cepas de *C. albicans* testadas, atingindo uma Concentração Inibitória Mínima três vezes maior.

No estudo de Martins *et al.* (2007) ao analisar o óleo essencial de *Piper claussonianum* verificou uma alta concentração de trans- nerolidol (81,4%), fortemente associado a sua capacidade de regular negativamente a formação de hifas. No estudo de Pontin *et al.* (2015) ao testar o Nerolidol pelo método de difusão em disco (4 µg/disc) frente ao fungo *Sclerotium cepivorum* além de ter causado a inibição do crescimento de fungos, observações por microscopia eletrônica estabeleceram alterações morfológicas nas hifas, como danos na integridade da membrana fúngica, que foram expostas ao terpinoleno e ao nerolidol, corroborando com o nosso estudo onde ao percebermos a redução da formação das hifas, possivelmente por lesão membranosa.

Assim como os outros terpenos, não foram encontradas muitas pesquisas envolvendo o cariofileno em atuação isolada com atividade antifúngica, no entanto, utilizamos trabalhos como referência que usaram óleos essenciais onde o trans- cariofileno era componente principal, como no trabalho de Pereira *et al.* (2017) ao testarem o óleo essencial puro e suas frações ricas em sesquiterpenos de folhas de *Casearia sylvestris* Sw onde. o cariofileno foi um composto majoritário, obtiveram um resultado interessante do óleo puro frente a cepa *C. krusei* com uma CI₅₀ de 74,3 µg / mL.

O potencial dos sesquiterpenos contra a candidíase foi relatado anteriormente (DALLEAU *et al.*, 2008, MARTÍNEZ *et al.*, 2014). Ambos os compostos apresentam o esqueleto básico do cariofileno sesquiterpeno bíclico, e há estudos que identificaram óleos essenciais contendo sesquiterpenos β-cariofileno e óxido de β-cariofileno como uma terapia alternativa para candidíase (ASDADI *et al.*, 2015).

Com isso, fica claro que os óleos essenciais com grande quantidade de cariofileno e seus isômeros (β-cariofileno e α-humuleno) apresentam ação antimicrobiana e antifúngica (SABULAL *et al.*, 2006). Além disso, os sesquiterpenos β-cariofileno e óxido de cariofileno conseguem ser captados pela membrana celular do fungo e agir como agente antifúngico (SARPIETRO *et al.*, 2015).

Asdadi *et al.* (2015) ao testarem o óleo essencial das sementes de *Vitex agnus-castus*, onde o cariofileno foi um de seus constituintes majoritários observaram a atividade antifúngica significativa contra todas as cepas de *Candida* testadas, dentre elas *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, em vários graus, apresentando uma atividade antifúngica mais eficiente que os controles medicamentosos fluconazol e a anfotericina B, com os diâmetros da zona de inibição variando de 35 mm a 58 mm.

Wang *et al.* (2020) ao usar o β -Cariofileno lipossomal no tratamento de lesões neurovasculares em ratos, os lipossomas usados apresentaram caracterização semelhantes ao do presente trabalho, a distribuição de tamanho médio era $189,3 \pm 3,8$ nm e o potencial Zeta médio distribuição foi $-13,9 \pm 0,3$ mV.

7 CONCLUSÃO

- Os lipossomas apresentaram em populações polidispersas, com tamanhos diversos, pela microscopia eletrônica de varredura com formatos esféricos e com cargas dentro do padrão esperado para garantir a estabilidade;
- Em relação à atividade antifúngica, os dados indicam que nos ensaios de microdiluição os sesquiterpenos apresentaram atividades semelhantes, com gráficos bem parecidos, sendo que nas formas isolada e lipossomal não apresentaram atividade antifúngica significativa;
- A Concentração Fungicida Mínima revelou um efeito fungistático. Os sesquiterpenos isolados associados ao fluconazol apresentaram um efeito antagônico frente a *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. No entanto, na forma lipossomal, todos os sesquiterpenos potencializaram a ação do fármaco fluconazol frente às respectivas cepas, apresentando um efeito sinérgico;
- Com exceção do trans- cariofileno em associação ao FCZ que não apresentou efeito antifúngico nos testes de microdiluição, apenas frente à *Candida krusei*, no entanto seu efeito foi indiferente, visto que, atuou semelhantemente ao controle do fármaco;
- Em relação à atuação no dimorfismo fúngico, o farnesol, trans-cariofileno e Bisabolol isolado e lipossomal inibiram 100% da virulência fúngica em *Candida albicans*, em relação à *Candida tropicalis* o farnesol isolado inibiu totalmente a formação de estruturas filamentosas na maior concentração (CFM/8). Em *C. krusei* a inibição não foi significativa;
- O bisabolol e o TC isolado não apresentaram um efeito inibitório significativo frente a *C. tropicalis*, entretanto ambos na maior concentração inibiram 100% o crescimento filamentoso frente a cepa *C. krusei*. O nerolidol livre e lipossomal não apresentaram potencial de inibição filamentosa em nenhuma das concentrações nas cepas testadas;
- O efeito potencializador de fármaco fluconazol, foi o principal destaque desse trabalho, considerando que a concentração dos compostos, associados, foi reduzida consideravelmente, sendo isso um fato importante, devido a uma possível redução da toxicidade celular;
- Este é o primeiro registro da atividade antifúngica desses sesquiterpenos em sistema lipossomal em associação ao fluconazol.

REFERÊNCIAS

- ABOULAILA, Mahmoud et al. Inhibitory effect of terpene nerolidol on the growth of *Babesia* parasites. **Parasitology international**, v. 59, n. 2, p. 278-282, 2010.
- AGRAWAL, Udit et al. Multifunctional nanomedicines: potentials and prospects. **Drug delivery and translational research**, v. 3, n. 5, p. 479-497, 2013.
- AGUSTÍN, M. D. R. et al. Effect of *quorum sensing* molecules and natamycin on biofilms of *Candida tropicalis* and other yeasts isolated from industrial juice filtration membranes. **Journal of applied microbiology**, v. 126, n. 6, p. 1808-1820, 2019.
- ALLEN, Theresa M.; CULLIS, Pieter R. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. **Advanced drug delivery reviews**, v. 65, n. 1, p. 36-48, 2013.
- ALLEN, T. M. et al. Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly (ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives *in vivo*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1066, n. 1, p. 29-36, 1991.
- ALMEIDA, Paulo FF. Thermodynamics of lipid interactions in complex bilayers. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1788, n. 1, p. 72-85, 2009.
- ALONSO, Lais et al. *In vitro* antileishmanial and cytotoxic activities of nerolidol are associated with changes in plasma membrane dynamics. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1861, n. 6, p. 1049-1056, 2019.
- ALVIANO, W. S. et al. Antimicrobial activity of *Croton cajucara* Benth linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 20, n. 2, p. 101-105, 2005.
- ANDES, David R. et al. The epidemiology and outcomes of invasive *Candida* infections among organ transplant recipients in the United States: results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET). **Transplant Infectious Disease**, v. 18, n. 6, p. 921-931, 2016.
- ANDRONESCU, Ecaterina; GRUMEZESCU, Alexandru Mihai (Ed.). **Nanostructures for drug delivery**. Elsevier, 2017.
- ARRUDA, Denise C. et al. Antileishmanial activity of the terpene nerolidol. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 1679-1687, 2005.
- ASDADI, Ali et al. Study on chemical analysis, antioxidant and *in vitro* antifungal activities of essential oil from wild *Vitex agnus-castus* L. seeds growing in area of Argan Tree of Morocco against clinical strains of *Candida* responsible for nosocomial infections. **Journal de mycologie medicale**, v. 25, n. 4, p. e118-e127, 2015.
- AZZI, Joyce et al. First evaluation of drug-in-cyclodextrin-in-liposomes as an encapsulating system for nerolidol. **Food chemistry**, v. 255, p. 399-404, 2018.
- BAKKALI, Fadil et al. Biological effects of essential oils—a review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

- BANGHAM, A. D.; STANDISH, Malcolm M.; WATKINS, Jeff C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **Journal of molecular biology**, v. 13, n. 1, p. 238-277, 1965.
- BARAC, Aleksandra et al. Investigation of a healthcare-associated *Candida tropicalis* candidiasis cluster in a haematology unit and a systematic review of nosocomial outbreaks. **Mycoses**, v. 63, n. 4, p. 326-333, 2020.
- BARROS, Neuza B. et al. Liposomal-lupane system as alternative chemotherapy against cutaneous leishmaniasis: Macrophage as target cell. **Experimental parasitology**, v. 135, n. 2, p. 337-343, 2013.
- BATISTA, Cinthia Meireles; CARVALHO, Cícero Moraes Barros de; MAGALHAES, Nereide Stela Santos. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo , v. 43, n. 2, p. 167-179, June 2007 .
- BEASLEY, Knox; PANACH, Kamaldeep; DOMINGUEZ, Arturo R. Disseminated *Candida tropicalis* presenting with ecthyma-gangrenosum-like lesions. **Dermatology online journal**, v. 22, n. 1, 2016.
- BERKOW, Elizabeth L.; LOCKHART, Shawn R. Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. **Infection and drug resistance**, v. 10, p. 237, 2017.
- BHATIA, S. P. et al. Fragrance material review on α -bisabolol. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 11, p. S72-S76, 2008.
- BLECHER, Karin; NASIR, Adnan; FRIEDMAN, Adam. The growing role of nanotechnology in combating infectious disease. **Virulence**, v. 2, n. 5, p. 395-401, 2011.
- BLUMBERG, Henry M. et al. Risk factors for candidal bloodstream infections in surgical intensive care unit patients: the NEMIS prospective multicenter study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 2, p. 177-186, 2001.
- BOUAAOUD, Clotilde et al. Formulation and antifungal performance of natamycin-loaded liposomal suspensions: the benefits of sterol-enrichment. **Journal of Liposome Research**, v. 26, n. 2, p. 103-112, 2016.
- BOZÓ, Aliz et al. The *in vitro* and *in vivo* efficacy of fluconazole in combination with farnesol against *Candida albicans* isolates using a murine vulvovaginitis model. **Journal of Microbiology**, v. 54, n. 11, p. 753-760, 2016.
- BOZZUTO, Giuseppina; MOLINARI, Agnese. Liposomes as nanomedical devices. **International journal of nanomedicine**, v. 10, p. 975, 2015.
- BRANDL, M. et al. Liposome preparation by a new high pressure homogenizer Gaulin Micron Lab 40. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 16, n. 14, p. 2167-2191, 1990.
- BREHM-STECHER, Byron F.; JOHNSON, Eric A. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol, and apitone. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 10, p. 3357-3360, 2003.

BROWN, Gordon D. et al. Hidden killers: human fungal infections. **Science translational medicine**, v. 4, n. 165, p. 165rv13-165rv13, 2012.

BRUNKE, E.-J.; HAMMERSCHMIDT, F.-J. Constituents of the essential oil of *Salvia stenophylla*—first identification of (+)-epi- α -bisabolol in nature. In: **Essential oils and aromatic plants**. Springer, Dordrecht, 1985. p. 145-150.

BUCKINGHAM, John (Ed.). **Dictionary of natural products, supplement 4**. CRC press, 1997.

BUDAI, M.; SZOGYI, M. Liposomes as drug carrier systems. Preparation, classification and therapeutic advantages of liposomes. **Acta Pharmaceutica Hungarica**, v. 71, n. 1, p. 114-118, 2001.

CARNEIRO, Joara Nályda Pereira et al. *Piper diospyrifolium* Kunth.: Chemical analysis and antimicrobial (intrinsic and combined) activities. **Microbial Pathogenesis**, v. 136, p. 103700, 2019.

CAVALIERI, Elisabetta et al. Involvement of mitochondrial permeability transition pore opening in α -bisabolol induced apoptosis. **The FEBS journal**, v. 276, n. 15, p. 3990-4000, 2009.

CEVALLOS, Peggy A. Ponce; BUERA, Maria P.; ELIZALDE, Beatriz E. Encapsulation of cinnamon and thyme essential oils components (cinnamaldehyde and thymol) in β -cyclodextrin: Effect of interactions with water on complex stability. **Journal of Food Engineering**, v. 99, n. 1, p. 70-75, 2010.

CHAN, Weng-Keong et al. Nerolidol: a sesquiterpene alcohol with multi-faceted pharmacological and biological activities. **Molecules**, v. 21, n. 5, p. 529, 2016.

CHANG, Hsin-I.; YEH, Ming-Kung. Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy. **International journal of nanomedicine**, v. 7, p. 49, 2012.

CHO, Jae Young et al. Amelioration of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice by oral administration of β -caryophyllene, a sesquiterpene. **Life sciences**, v. 80, n. 10, p. 932-939, 2007.

COLOMBO, Arnaldo L. et al. Prospective observational study of candidemia in Sao Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 28, n. 5, p. 570-6, 2007.

CONTI, Heather R. et al. Animal models for candidiasis. **Current protocols in immunology**, v. 105, n. 1, p. 19.6. 1-19.6. 17, 2014.

CORDEIRO, Rossana D. A. et al. Farnesol inhibits in vitro growth of the *Cryptococcus neoformans* species complex with no significant changes in virulence-related exoenzymes. **Veterinary microbiology**, v. 159, n. 3-4, p. 375-380, 2012.

- CORDEIRO, Rossana A. et al. Minimum inhibitory concentrations of amphotericin B, azoles and caspofungin against *Candida* species are reduced by farnesol. **Medical mycology**, v. 51, n. 1, p. 53-59, 2013.
- CORDEIRO, Rossana de Aguiar et al. Farnesol inhibits planktonic cells and antifungal-tolerant biofilms of *Trichosporon asahii* and *Trichosporon inkin*. **Medical mycology**, v. 57, n. 8, p. 1038-1045, 2019.
- CORMODE, David P.; NAHA, Pratap C.; FAYAD, Zahi A. Nanoparticle contrast agents for computed tomography: a focus on micelles. **Contrast media & molecular imaging**, v. 9, n. 1, p. 37-52, 2014.
- COSTA-DE-OLIVEIRA, S. et al. A first Portuguese epidemiological survey of fungaemia in a university hospital. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 365-374, 2008.
- COUTINHO, Henrique DM et al. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. **Chemotherapy**, v. 54, n. 4, p. 328-330, 2008.
- CROMMELIN, Daan JA; VAN HOOGEVEST, Peter; STORM, Gert. The role of liposomes in clinical nanomedicine development. What now? Now what?. **Journal of Controlled Release**, v. 318, p. 256-263, 2020.
- CUENCA-ESTRELLA, Manuel. Antifúngicos en el tratamiento de las infecciones sistémicas: importancia del mecanismo de acción, espectro de actividad y resistencias. **Rev Esp Quimioter**, v. 23, n. 4, p. 169-176, 2010.
- CURVELO, J. A. R. et al. A novel nerolidol-rich essential oil from *Piper clausenianum* modulates *Candida albicans* biofilm. **Journal of medical microbiology**, v. 63, n. 5, p. 697-702, 2014.
- CYSNE, Juliana B. et al. Leaf essential oils of four Piper species from the State of Ceará-Northeast of Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6B, p. 1378-1381, 2005.
- DADAR, Maryam et al. *Candida albicans*-Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control—An update. **Microbial pathogenesis**, v. 117, p. 128-138, 2018.
- DAHAM, Saad S. et al. The anticancer, antioxidant and antimicrobial properties of the sesquiterpene β -caryophyllene from the essential oil of *Aquilaria crassna*. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 11808-11829, 2015.
- DALLEAU, Stéphanie et al. *In vitro* activity of terpenes against *Candida* biofilms. **International journal of antimicrobial agents**, v. 31, n. 6, p. 572-576, 2008.
- DARAEI, Hadis et al. Application of liposomes in medicine and drug delivery. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 44, n. 1, p. 381-391, 2016.

- DAVIDSON, R. N. et al. Liposomal amphotericin B (AmBisome) in Mediterranean visceral leishmaniasis: a multi-centre trial. **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 87, n. 2, p. 75-81, 1994.
- DAVIS-HANNA, Amber et al. Farnesol and dodecanol effects on the *Candida albicans* Ras1-cAMP signalling pathway and the regulation of morphogenesis. **Molecular microbiology**, v. 67, n. 1, p. 47-62, 2008.
- DE ARAÚJO LOPES, Sávila Caldeira et al. Liposomes as carriers of anticancer drugs. **Cancer treatment—conventional and innovative approaches**, 2013.
- DE CARVALHO, Rusbene BF et al. Nerolidol and its pharmacological application in treating neurodegenerative diseases: a review. **Recent patents on biotechnology**, v. 12, n. 3, p. 158-168, 2018.
- DE CREMER, Kaat et al. Combinatorial drug approaches to tackle *Candida albicans* biofilms. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 13, n. 8, p. 973-984, 2015.
- DEGENHARDT, Jörg; KÖLLNER, Tobias G.; GERSHENZON, Jonathan. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. **Phytochemistry**, v. 70, n. 15-16, p. 1621-1637, 2009.
- DE LUCCA, Anthony J. et al. Fungicidal and bactericidal properties of bisabolol and drigosantol. **Journal of Essential Oil Research**, v. 23, n. 3, p. 47-54, 2011.
- DE MELO, Nathalya Isabel de et al. Antimicrobial activity of the essential oil of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd.(Lamiaceae) against cariogenic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 519-525, 2015.
- DE SALAS, Felipe; MARTÍNEZ, María Jesús; BARRIUSO, Jorge. Quorum-sensing mechanisms mediated by farnesol in *Ophiostoma piceae*: effect on secretion of sterol esterase. **Applied and environmental microbiology**, v. 81, n. 13, p. 4351-4357, 2015.
- DE SOUZA, Alexandre Teixeira et al. Supercritical extraction process and phase equilibrium of Candeia (*Eremanthus erythropappus*) oil using supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, n. 2, p. 182-187, 2008.
- DE SOUZA, Cássia Milena et al. Changes in Adhesion of *Candida tropicalis* Clinical Isolates Exhibiting Switch Phenotypes to Polystyrene and HeLa Cells. **Mycopathologia**, v. 186, n. 1, p. 81-91, 2021.
- DEMUNER, Antonio Jacinto et al. Seasonal variation in the chemical composition and antimicrobial activity of volatile oils of three species of *Leptospermum* (Myrtaceae) grown in Brazil. **Molecules**, v. 16, n. 2, p. 1181-1191, 2011.
- DEORUKHKAR, Sachin C.; SAINI, Santosh; MATHEW, Stephen. Virulence factors contributing to pathogenicity of *Candida tropicalis* and its antifungal susceptibility profile. **International Journal of Microbiology**, v. 2014, 2014.

- DERENGOWSKI, Lorena S. et al. Antimicrobial effect of farnesol, a *Candida albicans* quorum sensing molecule, on *Paracoccidioides brasiliensis* growth and morphogenesis. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2009.
- DETONI, C. B. et al. Essential oil from *Zanthoxylum tingoassuiba* loaded into multilamellar liposomes useful as antimicrobial agents. **Journal of microencapsulation**, v. 26, n. 8, p. 684-691, 2009.
- DIMOPOULOS, George et al. *Candida albicans* versus non-*albicans* intensive care unit-acquired bloodstream infections: differences in risk factors and outcome. **Anesthesia & Analgesia**, v. 106, n. 2, p. 523-529, 2008.
- DIMOPOULOS, G. et al. Candidemia in immunocompromised and immunocompetent critically ill patients: a prospective comparative study. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 26, n. 6, p. 377-384, 2007.
- DÍŽOVÁ, S.; BUJDÁKOVÁ, H. Properties and role of the quorum sensing molecule farnesol in relation to the yeast *Candida albicans*. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 72, n. 6, p. 307-312, 2017.
- DUKE, James A. **Handbook of medicinal herbs**. CRC press, 2002.
- DUNCAN, Robin E.; ARCHER, Michael C. Farnesol Decreases Serum Triglycerides in Rats: Identification of Mechanisms Including Up-Regulation of PPAR α and Down-Regulation of Fatty Acid Synthase in Hepatocytes. **Lipids**, v. 43, n. 7, p. 619-627, 2008.
- EDRIS, Amr E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 21, n. 4, p. 308-323, 2007.
- EL-KATTAN, Ayman F. et al. The effects of terpene enhancers on the percutaneous permeation of drugs with different lipophilicities. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 215, n. 1-2, p. 229-240, 2001.
- ERNST, Erika J. et al. *In vitro* pharmacodynamic properties of MK-0991 determined by time-kill methods. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 33, n. 2, p. 75-80, 1999.
- FAN, Xin et al. Notable increasing trend in azole non-susceptible *Candida tropicalis* causing invasive candidiasis in China (August 2009 to July 2014): molecular epidemiology and clinical azole consumption. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 464, 2017.
- FERNANDES COSTA, Adelaide et al. Development, characterization, and *in vitro*–*in vivo* evaluation of polymeric nanoparticles containing miconazole and farnesol for treatment of vulvovaginal candidiasis. **Medical mycology**, v. 57, n. 1, p. 52-62, 2019.
- FERNANDES, Elizabeth S. et al. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (–)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European journal of pharmacology**, v. 569, n. 3, p. 228-236, 2007.

FERNANDES, Renan Aparecido et al. Biofilm formation by *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* in the presence of farnesol: a quantitative evaluation. **Biofouling**, v. 32, n. 3, p. 329-338, 2016.

FERNANDES, Lorena F. et al. Recent advances in the therapeutic and diagnostic use of liposomes and carbon nanomaterials in ischemic stroke. **Frontiers in neuroscience**, v. 12, p. 453, 2018.

FESTEKJIAN, Ara; NEELY, Michael. Incidence and predictors of invasive candidiasis associated with candidaemia in children. **Mycoses**, v. 54, n. 2, p. 146-153, 2011.

FIX, Samantha M.; BORDEN, Mark A.; DAYTON, Paul A. Therapeutic gas delivery via microbubbles and liposomes. **Journal of Controlled Release**, v. 209, p. 139-149, 2015.

FLEISCHMANN, Jacob; BROECKLING, Corey D.; LYONS, Sarah. *Candida krusei* form mycelia along agar surfaces towards each other and other *Candida* species. **BMC microbiology**, v. 17, n. 1, p. 1-7, 2017.

FREZARD, Frédéric. Liposomes: from biophysics to the design of peptide vaccines. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, n. 2, 1999.

FRÉZARD, Frédéric et al. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Química nova**, v. 28, n. 3, p. 511-518, 2005.

FRIDKIN, Scott K. et al. Changing incidence of *Candida* bloodstream infections among NICU patients in the United States: 1995–2004. **Pediatrics**, v. 117, n. 5, p. 1680-1687, 2006.

FRIEDMAN, Adam J. et al. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of chitosan–alginate nanoparticles: A targeted therapy for cutaneous pathogens. **Journal of investigative Dermatology**, v. 133, n. 5, p. 1231-1239, 2013.

FURUKAWA, Roberto. Experimental study and model of the physical chemical properties of liposome under ultrasonic irradiation. In: **2010 3rd IEEE RAS & EMBS International Conference on Biomedical Robotics and Biomechatronics**. IEEE, 2010. p. 843-848.

GALÁN-LADERO, María Ángeles et al. *Candida tropicalis* biofilm formation and expression levels of the CTRG ALS-like genes in sessile cells. **Yeast**, v. 36, n. 2, p. 107-115, 2019.

GALDINO, Pablinny Moreira et al. The anxiolytic-like effect of an essential oil derived from *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil. leaves and its major component, β -caryophyllene, in male mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 38, n. 2, p. 276-284, 2012.

GALPER, Merav W. et al. Effect of computed tomography scanning parameters on gold nanoparticle and iodine contrast. **Investigative radiology**, v. 47, n. 8, p. 475, 2012.

GERSHENZON, Jonathan; DUDAREVA, Natalia. The function of terpene natural products in the natural world. **Nature chemical biology**, v. 3, n. 7, p. 408-414, 2007.

GERTSCH, Jürg et al. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 26, p. 9099-9104, 2008.

GHELARDINI, Carla; GALEOTTI, Nicoletta; MAZZANTI, Gabriela. Local anaesthetic activity of monoterpenes and phenylpropanes of essential oils. **Planta medica**, v. 67, n. 6, p. 564-566, 2001.

GOMES-CARNEIRO, M. R. et al. Evaluation of mutagenic and antimutagenic activities of α -bisabolol in the Salmonella/microsome assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 585, n. 1-2, p. 105-112, 2005.

GOULART, Herbert Rodrigues et al. Terpenes arrest parasite development and inhibit biosynthesis of isoprenoids in *Plasmodium falciparum*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 7, p. 2502-2509, 2004.

GUDLAUGSSON, Olafur et al. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37, n. 9, p. 1172-1177, 2003.

GUNSALUS, Kearney TW et al. Manipulation of host diet to reduce gastrointestinal colonization by the opportunistic pathogen *Candida albicans*. **MSphere**, v. 1, n. 1, 2016.

GÜNTHER, Kurt et al. Semi-preparative liquid-chromatographic separation of all four stereoisomers of α -bisabolol on tribenzoylcellulose. **Fresenius' journal of analytical chemistry**, v. 345, n. 12, p. 787-790, 1993.

HADRICH, I.; AYADI, A. Epidemiology of antifungal susceptibility: review of literature. **Journal de mycologie medicale**, v. 28, n. 3, p. 574-584, 2018.

HAJIPOUR, Mohammad J. et al. Antibacterial properties of nanoparticles. **Trends in biotechnology**, v. 30, n. 10, p. 499-511, 2012.

HANN, Ian M.; PRENTICE, H. Grant. Lipid-based amphotericin B: a review of the last 10 years of use. **International journal of antimicrobial agents**, v. 17, n. 3, p. 161-169, 2001.

HARASHIMA, Hideyoshi et al. Enhanced hepatic uptake of liposomes through complement activation depending on the size of liposomes. **Pharmaceutical research**, v. 11, n. 3, p. 402-406, 1994.

HARBORNE, Jeffrey B.; TOMAS-BARBERAN, Francisco A. **Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids**. Clarendon Press, 1991.

HAS, C.; SUNTHAR, P. A comprehensive review on recent preparation techniques of liposomes. **Journal of liposome research**, v. 30, n. 4, p. 336-365, 2020.

HE, Xiaowen et al. Correlation between Chemical Composition and Antifungal Activity of *Clausena lansium* Essential Oil against *Candida* spp. **Molecules**, v. 24, n. 7, p. 1394, 2019.

HECTOR, R. F.; BRAUN, Phyllis C. Synergistic action of nikkomycins X and Z with papulacandin B on whole cells and regenerating protoplasts of *Candida albicans*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 29, n. 3, p. 389-394, 1986.

HENRIQUES, Mariana et al. Effect of farnesol on *Candida dubliniensis* morphogenesis. **Letters in applied microbiology**, v. 44, n. 2, p. 199-205, 2007.

HISAJIMA, Tatsuya et al. Protective effects of farnesol against oral candidiasis in mice. **Microbiology and immunology**, v. 52, n. 7, p. 327-333, 2008.

HO, Jemima et al. *Candida albicans* and candidalysin in inflammatory disorders and cancer. **Immunology**, v. 162, n. 1, p. 11-16, 2021.

HOET, Sara et al. Antitrypanosomal compounds from the leaf essential oil of *Strychnos spinosa*. **Planta medica**, v. 72, n. 05, p. 480-482, 2006.

HOLLIS, L.; JONES, R. S. US Environmental Protection Agency Office of Pesticide Programs. **Biopesticides and Pollution Prevention Division, Farnesol Nerolidol**, v. 1, p. 24, 2009.

HOLUB, M.; HEROUT, V.; SORM, F. Synthesis of Alpha-Bisabolol--A Spasmolytically Active Sequiterpenic Alcohol. **Ceskoslovenska farmacie**, v. 4, n. 3, p. 129-131, 1955.

HONARY, Soheyla; ZAHIR, Foruhe. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 2). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, p. 265-273, 2013.

HOPE, M. J. et al. Generation of multilamellar and unilamellar phospholipid vesicles. **Chemistry and physics of lipids**, v. 40, n. 2-4, p. 89-107, 1986.

HOPE, M. J. et al. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 812, n. 1, p. 55-65, 1985.

HORNBY, Jacob M. et al. *Quorum sensing* in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 7, p. 2982-2992, 2001.

HSU, Chih-Chieh et al. The inhibitory activity of linalool against the filamentous growth and biofilm formation in *Candida albicans*. **Medical mycology**, v. 51, n. 5, p. 473-482, 2013.

HUANG, Chun-Ming et al. Eradication of drug resistant *Staphylococcus aureus* by liposomal oleic acids. **Biomaterials**, v. 32, n. 1, p. 214-221, 2011.

HUH, Ae Jung; KWON, Young Jik. "Nanoantibiotics": a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. **Journal of controlled release**, v. 156, n. 2, p. 128-145, 2011.

IMMORDINO, Maria Laura; DOSIO, Franco; CATTEL, Luigi. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. **International journal of nanomedicine**, v. 1, n. 3, p. 297, 2006.

JABRA-RIZK, Mary Ann et al. Effect of farnesol on *Candida dubliniensis* biofilm formation and fluconazole resistance. **FEMS yeast research**, v. 6, n. 7, p. 1063-1073, 2006.

JAMIU, A. T. et al. Update on *Candida krusei*, a potential multidrug-resistant pathogen. **Medical mycology**, v. 59, n. 1, p. 14-30, 2021.

JAVADPOUR, Maryam M. et al. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal of medicinal chemistry**, v. 39, n. 16, p. 3107-3113, 1996.

- JOHANN, Susana et al. Activity of compounds isolated from *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Medical mycology**, v. 50, n. 8, p. 843-851, 2012.
- JOHNSON, S. M. et al. Single bilayer liposomes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 233, n. 3, p. 820-826, 1971.
- JOO, Joung Hyuck; JETTEN, Anton M. Molecular mechanisms involved in farnesol-induced apoptosis. **Cancer letters**, v. 287, n. 2, p. 123-135, 2010.
- JORGENSEN, Betina. Gas-phase oxidation of aqueous ethanol by nanoparticle vanadia/anatase catalysts. **Topics in Catalysis**, v. 52, n. 3, p. 253-257, 2009.
- JUNG, Heejung; KITTELSON, David B.; ZACHARIAH, Michael R. The influence of a cerium additive on ultrafine diesel particle emissions and kinetics of oxidation. **Combustion and flame**, v. 142, n. 3, p. 276-288, 2005.
- KASHEM, Sakeen W. et al. *Candida albicans* morphology and dendritic cell subsets determine T helper cell differentiation. **Immunity**, v. 42, n. 2, p. 356-366, 2015.
- KATIIYAR, S. K.; EDLIND, T. D. Identification and expression of multidrug resistance related ABC transporter genes in *Candida krusei*. **Sabouraudia**, v. 39, n. 1, p. 109-116, 2001.
- KATRAGKOU, Aspasia et al. *In vitro* interactions between farnesol and fluconazole, amphotericin B or micafungin against *Candida albicans* biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 2, p. 470-478, 2015.
- KHAN, Rehan; SULTANA, Sarwat. Farnesol attenuates 1, 2-dimethylhydrazine induced oxidative stress, inflammation and apoptotic responses in the colon of Wistar rats. **Chemico-biological interactions**, v. 192, n. 3, p. 193-200, 2011..
- KHAN, Amber et al. Ocimum sanctum essential oil and its active principles exert their antifungal activity by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity. **Research in microbiology**, v. 161, n. 10, p. 816-823, 2010.
- KIM, H. M. et al. Effect of *Syzygium aromaticum* extract on immediate hypersensitivity in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 60, n. 2, p. 125-131, 1998.
- KLOPELL, Fernando Canani et al. Nerolidol, an antiulcer constituent from the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 62, n. 7-8, p. 537-542, 2007.
- KOTHAVADE, Rajendra J. et al. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. **Journal of medical microbiology**, v. 59, n. 8, p. 873-880, 2010.
- KRISTAN, Katja; RIŽNER, Tea Lanišnik. Steroid-transforming enzymes in fungi. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 129, n. 1-2, p. 79-91, 2012.

KU, Chi-Mei; LIN, Jin-Yuarn. Farnesol, a sesquiterpene alcohol in herbal plants, exerts anti-inflammatory and antiallergic effects on ovalbumin-sensitized and-challenged asthmatic mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.

KYLE, Stuart; SAHA, Sikha. Nanotechnology for the detection and therapy of stroke. **Advanced healthcare materials**, v. 3, n. 11, p. 1703-1720, 2014.

LAMICHHANE, Narottam et al. Liposomes: clinical applications and potential for image-guided drug delivery. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 288, 2018.

LAMOTH, Frederic et al. Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. suppl_1, p. i4-i13, 2018.

LAMPING, E., et al. Abc1p is a multidrug efflux transporter that tips the balance in favor of innate azole resistance in *Candida krusei*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 53, 354–369, (2009). doi: 10.1128/AAC.01095-08

LANGFORD, Melanie L. et al. *Candida albicans* Czf1 and Efg1 coordinate the response to farnesol during quorum sensing, white-opaque thermal dimorphism, and cell death. **Eukaryotic cell**, v. 12, n. 9, p. 1281-1292, 2013.

LAPCZYNSKI, A. et al. Fragrance material review on nerolidol (isomer unspecified). **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 11, p. S247-S250, 2008.

LEE, Jong Hyun et al. Farnesol inhibits tumor growth and enhances the anticancer effects of bortezomib in multiple myeloma xenograft mouse model through the modulation of STAT3 signaling pathway. **Cancer letters**, v. 360, n. 2, p. 280-293, 2015.

LEITE, Gerlânia de Oliveira et al. Protective effect of (–)- α -bisabolol on rotenone-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 96, n. 4, p. 359-365, 2018..

LEONHARDT, Ines et al. The fungal quorum-sensing molecule farnesol activates innate immune cells but suppresses cellular adaptive immunity. **MBio**, v. 6, n. 2, 2015.

LEROUY, Olivier et al. Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005–2006). **Critical care medicine**, v. 37, n. 5, p. 1612-1618, 2009.

KADOSH, David; LOPEZ-RIBOT, Jose L. *Candida albicans*: adapting to succeed. **Cell host & microbe**, v. 14, n. 5, p. 483-485, 2013.

KHALIL, Ikramy A.; YAMADA, Yuma; HARASHIMA, Hideyoshi. Optimization of siRNA delivery to target sites: issues and future directions. **Expert opinion on drug delivery**, v. 15, n. 11, p. 1053-1065, 2018.

KOTHAVADE, Rajendra J. et al. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. **Journal of medical microbiology**, v. 59, n. 8, p. 873-880, 2010.

KLEIN-JÚNIOR, Luiz C. et al. The use of chemometrics to study multifunctional indole alkaloids from *Psychotria nemorosa* (Palicourea comb. nov.). Part I: Extraction and

fractionation optimization based on metabolic profiling. **Journal of Chromatography A**, v. 1463, p. 60-70, 2016.

KULLBERG, Bart Jan; ARENDRUP, Maiken C. Invasive candidiasis. **The New England journal of medicine**, v. 374, n. 8, p. 794, 2016.

LEUNG, A. Y. H. et al. *Candida tropicalis* fungaemia in adult patients with haematological malignancies: clinical features and risk factors. **Journal of Hospital Infection**, v. 50, n. 4, p. 316-319, 2002.

LEWIS, Russell E. Current concepts in antifungal pharmacology. In: **Mayo Clinic Proceedings**. Elsevier, 2011. p. 805-817.

LI, Xinming et al. Nano carriers for drug transport across the blood–brain barrier. **Journal of drug targeting**, v. 25, n. 1, p. 17-28, 2017.

LIU, Chi-Jen et al. Enhancement of cell radiation sensitivity by pegylated gold nanoparticles. **Physics in Medicine & Biology**, v. 55, n. 4, p. 931, 2010.

MACHADO, C. B. et al. In vitro evaluation of anti-fungal activity of tropicamide against strains of *Candida* spp. resistant to fluconazole in planktonic and biofilm form. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 31, n. 1, p. 101080, 2021.

MALLICK, Emily M.; BENNETT, Richard J. Sensing of the microbial neighborhood by *Candida albicans*. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 10, p. e1003661, 2013.

MARAK, Munmun B.; DHANASHREE, Biranthabail. Antifungal susceptibility and biofilm production of *Candida* spp. isolated from clinical samples. **International journal of microbiology**, v. 2018, 2018.

MARCH, Rosselló GA; EIROS, Bouza JM. *Quorum sensing* in bacteria and yeast. **Medicina clinica**, v. 141, n. 8, p. 353, 2013.

MARTÍNEZ, Alejandra et al. *In vitro* activity of terpenes against *Candida albicans* and ultrastructural alterations. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology**, v. 118, n. 5, p. 553-559, 2014.

MARTINS, Margarida et al. Morphogenesis control in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* through signaling molecules produced by planktonic and biofilm cells. **Eukaryotic cell**, v. 6, n. 12, p. 2429-2436, 2007.

MASSERINI, Massimo. Nanoparticles for brain drug delivery. **International Scholarly Research Notices**, v. 2013, 2013.

MCCARTY, Todd P.; PAPPAS, Peter G. Invasive candidiasis. **Infectious Disease Clinics**, v. 30, n. 1, p. 103-124, 2016.

MCGINTY, D.; LETIZIA, C. S.; API, A. M. Addendum to Fragrance material review on Nerolidol (isomer unspecified). **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. S43-S45, 2010.

MEDEIROS, Mariana Araújo Paulo de et al. Epidemiology and prognostic factors of nosocomial candidemia in Northeast Brazil: A six-year retrospective study. **PLoS One**, v. 14, n. 8, p. e0221033, 2019.

MEDICI N, POETA M. New insight on the development on fungal vaccines: from immunity to recent challenges. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2015; 110:966 e 73.

MENDES, J.M., 2011. **Investigação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Eugenia caryophyllata* Thunb. sobre cepas de *Candida tropicalis***. In: Dissertação de Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Universidade Federal da Paraíba – UFPB, João Pessoa – PB.

MERSEGUEL, Karina Bellinghausen et al. Genetic diversity of medically important and emerging *Candida* species causing invasive infection. **BMC infectious diseases**, v. 15, n. 1, p. 1-11, 2015.

MILLA, Paola; DOSIO, Franco; CATTEL, Luigi. PEGylation of proteins and liposomes: a powerful and flexible strategy to improve the drug delivery. **Current drug metabolism**, v. 13, n. 1, p. 105-119, 2012.

MIRAMON, Pedro; LORENZ, Michael C. A feast for *Candida*: metabolic plasticity confers an edge for virulence. **PLoS pathogens**, v. 13, n. 2, p. e1006144, 2017.

MONTEIRO, D. R. et al. Antifungal activity of tyrosol and farnesol used in combination against *Candida* species in the planktonic state or forming biofilms. **Journal of applied microbiology**, v. 123, n. 2, p. 392-400, 2017.

MORAIS-BRAGA, Maria Flaviana B. et al. *Psidium guajava* L. and *Psidium brownianum* Mart ex DC.: Chemical composition and anti-*Candida* effect in association with fluconazole. **Microbial pathogenesis**, v. 95, p. 200-207, 2016.

MOSEL, Daniel D. et al. Farnesol concentrations required to block germ tube formation in *Candida albicans* in the presence and absence of serum. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 8, p. 4938-4940, 2005.

NAMI, Sanam *et al.* Fungal vaccines, mechanism of actions and immunology: a comprehensive review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 333-344, 2019.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). (2002). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Document M100–S12. Wayne, PA: NCCLS.

NAVARATHNA, Dhammika HMLP et al. Effect of farnesol on a mouse model of systemic candidiasis, determined by use of a DPP3 knockout mutant of *Candida albicans*. **Infection and immunity**, v. 75, n. 4, p. 1609-1618, 2007.

NETT, Jeniel E.; ANDES, David R. Antifungal agents: spectrum of activity, pharmacology, and clinical indications. **Infectious Disease Clinics**, v. 30, n. 1, p. 51-83, 2016.

NEUWELT, Edward A. et al. Imaging of iron oxide nanoparticles by MR and light microscopy in patients with malignant brain tumours. **Neuropathology and applied neurobiology**, v. 30, n. 5, p. 456-471, 2004.

NOBILE, Clarissa J.; JOHNSON, Alexander D. *Candida albicans* biofilms and human disease. **Annual review of microbiology**, v. 69, p. 71-92, 2015.

NUCCI, Marcio; COLOMBO, Arnaldo L. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 58, n. 1, p. 77-82, 2007.

OLIVIER, Jean-Christophe. Drug transport to brain with targeted nanoparticles. **NeuroRx**, v. 2, n. 1, p. 108-119, 2005.

OSTROSKY-ZEICHNER, Luis et al. An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. **Nature reviews Drug discovery**, v. 9, n. 9, p. 719-727, 2010.

PAPPAS, Peter G. et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 48, n. 5, p. 503, 2009.

PAPPAS, Peter G. et al. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, n. 4, p. e1-e50, 2016.

PAPPAS, Peter G. et al. Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 1-20, 2018.

PARK, M. J. et al. Effect of citral, eugenol, nerolidol and α -terpineol on the ultrastructural changes of *Trichophyton mentagrophytes*. **Fitoterapia**, v. 80, n. 5, p. 290-296, 2009.

PATIL, Swanand et al. Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. **Biomaterials**, v. 28, n. 31, p. 4600-4607, 2007.

PAULI, Alexander; SCHILCHER, H. Infektionen, Entzündungen, Wunden: 18 Fallbeispiele zu (-)- α -Bisabolol. **Komplementäre und integrative Medizin**, v. 50, n. 4, p. 28-32, 2009.

PEDRO, André São et al. Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of (-)- α -bisabolol from particulate systems. **Biomedical Chromatography**, v. 23, n. 9, p. 966-972, 2009.

PELGRIFT, Robert Y.; FRIEDMAN, Adam J. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. **Advanced drug delivery reviews**, v. 65, n. 13-14, p. 1803-1815, 2013.

PENG, Tao et al. Therapeutic time window and dose dependence of xenon delivered via echogenic liposomes for neuroprotection in stroke. **CNS neuroscience & therapeutics**, v. 19, n. 10, p. 773-784, 2013.

PERBELLINI, Luigi et al. Determination of α -bisabolol in human blood by micro-HPLC-ion trap MS and head space-GC-MS methods. **Journal of Chromatography B**, v. 812, n. 1-2, p. 373-377, 2004.

PEREIRA, Flaviane G. et al. Antifungal activities of the essential oil and its fractions rich in sesquiterpenes from leaves of *Casearia sylvestris* Sw. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 4, p. 2817-2824, 2017.

PERLMAN, Or; WEITZ, Iris S.; AZHARI, Haim. Copper oxide nanoparticles as contrast agents for MRI and ultrasound dual-modality imaging. **Physics in Medicine & Biology**, v. 60, n. 15, p. 5767, 2015.

PERLROTH, Joshua; CHOI, Bryan; SPELLBERG, Brad. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. **Medical mycology**, v. 45, n. 4, p. 321-346, 2007.

PFALLER, Michael A.; DIEKEMA, Daniel J. Epidemiology of invasive mycoses in North America. **Critical reviews in microbiology**, v. 36, n. 1, p. 1-53, 2010.

PFALLER, Michael.A. et al. *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. **Journal of clinical microbiology**, v. 46, n. 2, p. 515-521, 2008.

PFALLER, Michael A. et al. Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance®) registry, 2004–2008. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 74, n. 4, p. 323-331, 2012.

PFALLER, Michael A. et al. Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-albicans species of *Candida* in 2,496 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) registry 2004–2008. **PloS one**, v. 9, n. 7, p. e101510, 2014.

PFALLER, Michael A.; DIEKEMA, Daniel J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical microbiology reviews**, v. 20, n. 1, p. 133-163, 2007.

PFALLER, Michael A. et al. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in Intensive Care Unit (ICU) and non-ICU settings in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008–2009). **International journal of antimicrobial agents**, v. 38, n. 1, p. 65-69, 2011.

PFALLER, Michael A. et al. Twenty years of the SENTRY antifungal surveillance program: results for *Candida* species from 1997–2016. In: **Open forum infectious diseases**. US: Oxford University Press, 2019. p. S79-S94.

PIMENTEL, Lúcio Figueira et al. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, p. 503-514, 2007.

POLKE, Melanie et al. Farnesol signalling in *Candida albicans*—more than just communication. **Critical reviews in microbiology**, v. 44, n. 2, p. 230-243, 2018.

PONS, Miquel; FORADADA, Mercè; ESTELRICH, Joan. Liposomes obtained by the ethanol injection method. **International journal of pharmaceutics**, v. 95, n. 1-3, p. 51-56, 1993.

PONTIN, Mariela et al. *Allium sativum* produces terpenes with fungistatic properties in response to infection with *Sclerotium cepivorum*. **Phytochemistry**, v. 115, p. 152-160, 2015.

PYBUS, David H.; SELL, Charles S.; SELL, Charles. Ingredients for the modern perfumery industry. In: **The Chemistry of Fragrances**. 1999. p. 51-124.

PUTTIPIATKHACHORN, Satit et al. Drug physical state and drug–polymer interaction on drug release from chitosan matrix films. **Journal of Controlled Release**, v. 75, n. 1-2, p. 143-153, 2001.

QUINDÓS, Guillermo. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. **Revista iberoamericana de micología**, v. 31, n. 1, p. 42-48, 2014.

RAMAGE, Gordon et al. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 11, p. 5459-5463, 2002.

RAMSDEN, Jeremy J. The music of the nanospheres. **Nanotechnology Perceptions**, v. 1, p. 53-64, 2005.

RENAME: National List of Essential Medicines: Rename 2020 / Ministry of Health, Secretariat of Science, Technology, Innovation and Strategic Health Supplies, Department of Pharmaceutical Assistance and Strategic Supplies. - Brasília: Ministry of Health, 2020

ROBBINS, Nicole; WRIGHT, Gerard D.; COWEN, Leah E. Antifungal drugs: the current armamentarium and development of new agents. **The Fungal Kingdom**, p. 903-922, 2017.

ROBBINS, Nicole; CAPLAN, Tavia; COWEN, Leah E. Molecular evolution of antifungal drug resistance. **Annual review of microbiology**, v. 71, p. 753-775, 2017.

RODRIGUEZ, Lourdes et al. A multi-centric Study of *Candida* bloodstream infection in Lima-Callao, Peru: Species distribution, antifungal resistance and clinical outcomes. **PLoS One**, v. 12, n. 4, p. e0175172, 2017.

ROEMER, Terry; KRYSAN, Damian J. Antifungal drug development: challenges, unmet clinical needs, and new approaches. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 4, n. 5, p. a019703, 2014.

RÓG, Tomasz et al. Ordering effects of cholesterol and its analogues. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1788, n. 1, p. 97-121, 2009.

ROSSIGNOL, Tristan et al. Transcriptional response of *Candida parapsilosis* following exposure to farnesol. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 7, p. 2304-2312, 2007.

SABINA, Jeffrey; BROWN, Victoria. Glucose sensing network in *Candida albicans*: a sweet spot for fungal morphogenesis. **Eukaryotic Cell**, v. 8, n. 9, p. 1314-1320, 2009.

SABULAL, Baby et al. Caryophyllene-rich rhizome oil of *Zingiber nimmonii* from South India: Chemical characterization and antimicrobial activity. **Phytochemistry**, v. 67, n. 22, p. 2469-2473, 2006.

SHAH, Sanket et al. Liposomes: Advancements and innovation in the manufacturing process. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2020.

SAITO, Alexandre Y. et al. Antimalarial activity of the terpene nerolidol. **International journal of antimicrobial agents**, v. 48, n. 6, p. 641-646, 2016.

SAKAGAMI, Toru et al. Antifungal susceptibility trend and analysis of resistance mechanism for *Candida* species isolated from bloodstream at a Japanese university hospital. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 25, n. 1, p. 34-40, 2019.

SARDI, J. C. O. et al. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of medical microbiology**, v. 62, n. 1, p. 10-24, 2013.

SARPIETRO, Maria Grazia et al. Interaction of β -caryophyllene and β -caryophyllene oxide with phospholipid bilayers: Differential scanning calorimetry study. **Thermochimica Acta**, v. 600, p. 28-34, 2015.

SASIDHARAN, Indu; MENON, A. Nirmala. Comparative chemical composition and antimicrobial activity fresh & dry ginger oils (*Zingiber officinale* Roscoe). **International Journal of Current Pharmaceutical Research**, v. 2, n. 4, p. 40-43, 2010.

SCHERPHOF, Gerrit L. et al. Uptake and intracellular processing of targeted and nontargeted liposomes by rat kupffer cells *in vivo and in vitro* a. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 446, n. 1, p. 368-384, 1985.

SCHMIEDEL, Yvonne; ZIMMERLI, Stephan. Common invasive fungal diseases: an overview of invasive candidiasis, aspergillosis, cryptococcosis, and Pneumocystis pneumonia. **Swiss medical weekly**, v. 146, p. w14281, 2016.

SEBAALY, Carine et al. Large-scale preparation of clove essential oil and eugenol-loaded liposomes using a membrane contactor and a pilot plant. **Journal of liposome research**, v. 26, n. 2, p. 126-138, 2016a.

SEBAALY, Carine et al. Preparation and characterization of clove essential oil-loaded liposomes. **Food chemistry**, v. 178, p. 52-62, 2015b.

SEGAL, Brahm H. et al. Prevention and early treatment of invasive fungal infection in patients with cancer and neutropenia and in stem cell transplant recipients in the era of newer broad-spectrum antifungal agents and diagnostic adjuncts. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, n. 3, p. 402-409, 2007.

SEKHON, Bupinder S. Food nanotechnology—an overview. **Nanotechnology, science and applications**, v. 3, p. 1, 2010.

SEMIGHINI, Camile P. et al. Farnesol-induced apoptosis in *Aspergillus nidulans* reveals a possible mechanism for antagonistic interactions between fungi. **Molecular microbiology**, v. 59, n. 3, p. 753-764, 2006.

SHAN, Jinghua; CHEN, Lixia; LU, Keliang. Protective effects of trans-caryophyllene on maintaining osteoblast function. **IUBMB life**, v. 69, n. 1, p. 22-29, 2017.

SHAPIRO, Rebecca S.; ROBBINS, Nicole; COWEN, Leah E. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 75, n. 2, p. 213-267, 2011.

SHARON, Victoria; EISEN, Daniel B.; FUNG, Maxwell A. Cutaneous septic emboli from *Candida tropicalis*. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 10, n. 9, p. 652, 2010.

SHIRTLIFF, Mark E. et al. Farnesol-induced apoptosis in *Candida albicans*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2392-2401, 2009.

SIDRIN, J.J.C., ROCHA, M.F.G., 2010. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 388.

SILVA, D. F. **Avaliação da atividade biológica de β -citronelol sobre *Candida albicans*.**, 2016. 62f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais Sintéticos e Bioativos – Farmacologia) – Universidade Federal da Paraíba, 2016.

SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., DE MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., & PETROVICK, P. R. (2017). **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Artmed Editora.

SIMÕES, Sérgio et al. On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times. **Advanced drug delivery reviews**, v. 56, n. 7, p. 947-965, 2004.

SITAREK, Przemysław et al. Antibacterial, anti-inflammatory, antioxidant, and antiproliferative properties of essential oils from hairy and normal roots of *Leonurus sibiricus* L. and their chemical composition. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2017, 2017.

SKÖLD, Maria et al. The fragrance chemical β -caryophyllene—air oxidation and skin sensitization. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 4, p. 538-545, 2006.

SPAMPINATO, Claudia; LEONARDI, Darío. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

SPEROTTO, A. R. M. et al. Cytotoxic mechanism of *Piper gaudichaudianum* Kunth essential oil and its major compound nerolidol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 57, p. 57-68, 2013.

STEINBACH, William J. Pediatric invasive candidiasis: epidemiology and diagnosis in children. **Journal of fungi**, v. 2, n. 1, p. 5, 2016.

STOPPA, Marcos Aurélio et al. Estudo comparativo entre as metodologias preconizadas pelo CLSI e pelo EUCAST para avaliação da atividade antifúngica. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 498-502, 2009.

TABANCA, Nurhayat et al. Chemical composition and antifungal activity of *Arnica longifolia*, *Aster hesperius*, and *Chrysanthemum nauseosus* essential oils. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 21, p. 8430-8435, 2007.

TAMBE, Yukihiro et al. Gastric cytoprotection of the non-steroidal anti-inflammatory sesquiterpene, β -caryophyllene. **Planta medica**, v. 62, n. 05, p. 469-470, 1996.

TAO, Ran; WANG, Cheng-Zhang; KONG, Zhen-Wu. Antibacterial/antifungal activity and synergistic interactions between polyphenols and other lipids isolated from *Ginkgo biloba* L. leaves. **Molecules**, v. 18, n. 2, p. 2166-2182, 2013.

TODA, Mitsuru et al. Population-based active surveillance for culture-confirmed candidemia—four sites, United States, 2012–2016. **MMWR Surveillance Summaries**, v. 68, n. 8, p. 1, 2019.

THOMPSON, Delma S.; CARLISLE, Patricia L.; KADOSH, David. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. **Eukaryotic cell**, v. 10, n. 9, p. 1173-1182, 2011.

TIAN, Boxue; POULTER, C. Dale; JACOBSON, Matthew P. Defining the product chemical space of monoterpenoid synthases. **PLoS computational biology**, v. 12, n. 8, p. e1005053, 2016.

TRIANA, Jorge et al. A chemotaxonomic study of endemic species of genus *Tanacetum* from the Canary Islands. **Phytochemistry**, v. 92, p. 87-104, 2013.

TURNER, Siobhán A.; BUTLER, Geraldine. The *Candida* pathogenic species complex. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 4, n. 9, p. a019778, 2014.

VAN ZYL, Robyn L. et al. The biological activities of 20 nature identical essential oil constituents. **Journal of Essential Oil Research**, v. 18, n. sup1, p. 129-133, 2006.

VEMURI, Sriram; RHODES, C. T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 70, n. 2, p. 95-111, 1995.

VENSKUTONIS, Petras Rimantas; DAPKEVICIUS, Airidas; BARANAUSKIENE, Marija. Composition of the essential oil of Lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) from Lithuania. **Journal of essential oil research**, v. 9, n. 1, p. 107-110, 1997.

WALECZEK, K. J. et al. Phase solubility studies of pure (–)- α -bisabolol and camomile essential oil with β -cyclodextrin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 55, n. 2, p. 247-251, 2003..

WALSH, Thomas J. et al. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. **Clinical infectious diseases**, v. 46, n. 3, p. 327-360, 2008.

WANG, Di et al. Clinical translation of immunoliposomes for cancer therapy: Recent perspectives. **Expert opinion on drug delivery**, v. 15, n. 9, p. 893-903, 2018.

WANG, Fang et al. β -Caryophyllene Liposomes Attenuate Neurovascular Unit Damage After Subarachnoid Hemorrhage in Rats. **Neurochemical Research**, 2020.

WANG, Jing et al. Physicochemical and release characterisation of garlic oil- β -cyclodextrin inclusion complexes. **Food chemistry**, v. 127, n. 4, p. 1680-1685, 2011.

WEBER, K.; SCHULZ, B.; RUHNKE, M. The *quorum-sensing* molecule E, E-farnesol—its variable secretion and its impact on the growth and metabolism of *Candida* species. **Yeast**, v. 27, n. 9, p. 727-739, 2010.

WEMPE, Michael F. et al. Pharmacokinetics of raloxifene in male Wistar–Hannover rats: influence of complexation with hydroxybutenyl- β -cyclodextrin. **International journal of pharmaceutics**, v. 346, n. 1-2, p. 25-37, 2008.

- WEN, Louise et al. Actividad antifúngica de cuatro plantas usadas en la medicina tradicional peruana: aislamiento de 3'-formil-2', 4', 6'-trihidroxidihidrochalcona, principio activo de *Psidium acutangulum*. **Revista de la Sociedad Química del Perú**, v. 77, n. 3, p. 199-204, 2011.
- WESTWATER, Caroline; BALISH, Edward; SCHOFIELD, David A. *Candida albicans*-conditioned medium protects yeast cells from oxidative stress: a possible link between *quorum sensing* and oxidative stress resistance. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 10, p. 1654-1661, 2005.
- WHALEY, Sarah G. et al. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-*albicans Candida* species. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 2173, 2017.
- WINGARD, John R. et al. Increase in *Candida krusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. **New England Journal of Medicine**, v. 325, n. 18, p. 1274-1277, 1991.
- WISSING, Sylvia A.; MÜLLER, Rainer H. Cosmetic applications for solid lipid nanoparticles (SLN). **International Journal of Pharmaceutics**, v. 254, n. 1, p. 65-68, 2003.
- WOODLE, Martin C. Sterically stabilized liposome therapeutics. **Advanced drug delivery reviews**, v. 16, n. 2-3, p. 249-265, 1995.
- WU, Yu Chiuan et al. Liposome-encapsulated farnesol accelerated tissue repair in third-degree burns on a rat model. **Burns**, v. 45, n. 5, p. 1139-1151, 2019.
- XIE, Chunfeng et al. Sesquiterpenes from *Carpesium macrocephalum* inhibit *Candida albicans* biofilm formation and dimorphism. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 25, n. 22, p. 5409-5411, 2015.
- YANG, Su-Pen et al. A risk factor analysis of healthcare-associated fungal infections in an intensive care unit: a retrospective cohort study. **BMC infectious diseases**, v. 13, n. 1, p. 1-10, 2013.
- YESUDHASON, Binesh Lal; MOHANRAM, Kalyani. *Candida tropicalis* as a predominant isolate from clinical specimens and its antifungal susceptibility pattern in a tertiary care hospital in Southern India. **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, v. 9, n. 7, p. DC14, 2015.
- YOO, Hyun-Jun; JWA, Su-Kyung. Inhibitory effects of β -caryophyllene on *Streptococcus mutans* biofilm. **Archives of oral biology**, v. 88, p. 42-46, 2018.
- YOO, Hyun-Jun; JWA, Su-Kyung. Efficacy of β -caryophyllene for periodontal disease related factors. **Archives of oral biology**, v. 100, p. 113-118, 2019.
- YU, Li-hua et al. Possible inhibitory molecular mechanism of farnesol on the development of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilm. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 2, p. 770-775, 2012.
- YU, Shuanbao et al. Study on virulence factors of *Candida tropicalis* isolated from clinical samples. **Zhonghua liu xing bing xue za zhi= Zhonghua liuxingbingxue zazhi**, v. 36, n. 10, p. 1162-1166, 2015.

ZHANG, L. et al. Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery. **Current medicinal chemistry**, v. 17, n. 6, p. 585-594, 2010.

ZUZA-ALVES, Diana L.; SILVA-ROCHA, Walicyranison P.; CHAVES, Guilherme M. An update on *Candida tropicalis* based on basic and clinical approaches. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1927, 2017.

APÊNDICE A - ANTIFUNGAL PROPERTIES OF NEROLIDOL-CONTAINING LIPOSOMES IN ASSOCIATION WITH FLUCONAZOLE



membranes



Article

Antifungal Properties of Nerolidol-Containing Liposomes in Association with Fluconazole

Camila Fonseca Bezerra ¹, José Geraldo de Alencar Júnior ², Rosilaine de Lima Honorato ³, Antonia Thassya Lucas dos Santos ³, Josefa Carolaine Pereira da Silva ³, Taís Gusmão da Silva ³, Antonio Linkoln Alves Borges Leal ⁴, Thiago Sampaio de Freitas ⁴, Thiago Adler Tavares Vieira ⁴, Janaína Esmeraldo Rocha ⁴, Débora Lima Sales ⁴, José Maria Barbosa Filho ⁵, Gabriela Ribeiro de Sousa ⁵, Allyson Pontes Pinheiro ³, Jaime Ribeiro-Filho ⁶, Henrique Douglas Melo Coutinho ^{4,*}, Maria Flaviana Bezerra Moraes-Braga ³ and Teresinha Gonçalves da Silva ⁷

¹ Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco-UFPE, Recife, PE 50670-901, Brazil; camilawasidi@gmail.com

² Department of Pharmacy, Federal University of Ceará-UFC, 60020-181 Fortaleza-CE, Brazil; junioralencar727@gmail.com

³ Department of Biological Sciences, Regional University of Cariri-URCA, Crato, CE 63105-010, Brazil; rosilainehonorato@gmail.com (R.d.L.H.); thassyalucas@hotmail.com (A.T.L.d.S.); carol.bio1881@outlook.com (J.C.P.d.S.); taigusmao96@gmail.com (T.G.d.S.); allysson.ponheiro@urca.br (A.P.P.); flavianamoraib@yahoo.com.br (M.F.B.M.-B.)

⁴ Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri-URCA, Crato, CE 63105-010, Brazil; antoniolinkoln@hotmail.com (A.L.A.B.L.); thiagocrato@hotmail.com (T.S.d.F.); thiago.a.t.vieira@gmail.com (T.A.T.V.); janainaesmeraldo@gmail.com (J.E.R.); debora.lima.sales@gmail.com (D.L.S.)

⁵ Department of Pharmacy, Federal University of Paraíba-UFPB, João Pessoa, PB 58051-900, Brazil; jbarbosa@ltf.ufpb.br (J.M.B.F.); grsousafarm@gmail.com (G.R.d.S.)

⁶ Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, BA 40296-710, Brazil; jaimeribeirofilho@gmail.com

⁷ Departament of Antibiotics, Federal University of Pernambuco-UFPE, Recife, PE 50670-901, Brazil; teresinha100@gmail.com

* Correspondence: hdmcoutinho@gmail.com; Tel.: +55-(88)-3102-1204

Received: 18 July 2020; Accepted: 17 August 2020; Published: 20 August 2020

Abstract: (1) Background: Infections by *Candida* species represent a serious threat to the health of immunocompromised individuals. Evidence has indicated that nerolidol has significant antifungal properties. Nonetheless, its use is restricted due to a low water solubility and high photosensitivity. The incorporation into liposomes may represent an efficient alternative to improve the physicochemical and biopharmaceutical properties of this compound. The present study aimed to characterize the antifungal properties of liposomal nerolidol, alone or in combination with fluconazole. Of note, this is the first study reporting the antifungal activity of liposomal nerolidol and its potentiating effect in association with fluconazole. (2) Methods: The Inhibitory Concentration 50%-IC₅₀ and minimum fungicide concentrations (MFC) of the substances against *Candida albicans* (CA), *Candida tropicalis* (CT), and *Candida krusei* (CK) were

APÊNDICE B- ANTIFUNGAL ACTIVITY OF FARNESOL INCORPORATED IN LIPOSOMES AND ASSOCIATED WITH FLUCONAZOLE.

Chemistry and Physics of Lipids 233 (2020) 104987



Contents lists available at ScienceDirect

Chemistry and Physics of Lipids

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemphyslip



Antifungal activity of farnesol incorporated in liposomes and associated with fluconazole

Camila Fonseca Bezerra^a, José Geraldo de Alencar Júnior^b, Rosilaine de Lima Honorato^c,
Antonia Thassya Lucas dos Santos^c, Josefa Carolaine Pereira da Silva^c, Taís Gusmão da Silva^c,
Antonio Linkoln Alves Borges Leal^d, Janaína Esmeraldo Rocha^d, Thiago Sampaio de Freitas^d,
Thiago Adler Tavares Vieira^{a,b,c,d,e,f,g,h}, Maria Clara Fonseca Bezerra^c, Débora Lima Sales^d,
Marta Regina Kerntopf^d, Gyllyandeson de Araujo Delmondes^d, José Maria Barbosa Filho^f,
Laisla Rangel Peixoto^f, Allyson Pontes Pinheiro^c, Jaime Ribeiro-Filho^g,
Henrique Douglas Melo Coutinho^{d,*}, Maria Flaviana Bezerra Moraes-Braga^c,
Teresinha Gonçalves da Silva^h

^a Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco- UFPE, Recife, PE, Brazil

^b Department of Pharmacy, Federal University of Ceará- UFC, Fortaleza, CE, Brazil

^c Department of Biological Sciences, Regional University of Cariri- URCA, Crato, CE, Brazil

^d Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri- URCA, Crato, CE, Brazil

^e Faculty of Medicine of Juazeiro do Norte- Estácio FMJ, Juazeiro do Norte- CE, Brazil

^f Department of Pharmacy, Federal University of Paraíba- UFPB, João Pessoa, PB, Brazil

^g Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, Bahia, Brazil

^h Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco- UFPE, Recife, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Farnesol
Liposomes
Fluconazole
Candida dimorphism
Antifungal effect

ABSTRACT

Candida infections represent a threat to human health. *Candida albicans* is the main causative agent of invasive candidiasis, especially in immunosuppressed patients. The emergence of resistant strains has required the development of new therapeutic strategies. In this context, the use of liposomes as drug carrier systems is a promising alternative in drug development. Thus, considering the evidence demonstrating that sesquiterpene farnesol is a bioactive compound with antifungal properties, this study evaluated the activity farnesol-containing liposomes against different *Candida* strains. The IC₅₀ of farnesol and its liposomal formulation was assessed *in vitro* using cultures of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, and *Candida krusei*. The Minimum Fungicidal Concentration (MFC) was established by subculture in solid medium. The occurrence of fungal dimorphism was analyzed using optical microscopy. The effects on antifungal resistance to fluconazole were assessed by evaluating the impact of combined therapy on the growth of *Candida* strains. The characterization of liposomes was carried out considering their vesicular size, polydispersion index, and zeta medium potential, in addition to electron microscopy analysis. Farnesol exerted an antifungal activity that might be associated with the inhibition of fungal dimorphism, especially in *Candida albicans*. The incorporation of farnesol into liposomes significantly increased its antifungal activity against *C. albicans*, *C. tropicalis*, and *C. krusei*. In addition, liposomal farnesol potentiated the action of fluconazole against *C. albicans* and *C. tropicalis*. On the other hand, the association of unconjugated farnesol with fluconazole resulted in antagonistic effects. In conclusion, farnesol-containing liposomes have the potential to be used in antifungal drug development. However, further research is required to investigate how the antifungal properties of farnesol are affected by the interaction with liposomes, contributing to the modulation of antifungal resistance to conventional drugs.

* Corresponding author at: Rua Coronel Antônio Luiz, 1161 - Pimenta, Crato, CE, 63105-010, Brazil.

E-mail addresses: hdmcoutinho@gmail.com, hdmcoutinho@urca.br (H.D.M. Coutinho).

<https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2020.104987>

Received 5 July 2020; Received in revised form 19 September 2020; Accepted 2 October 2020

Available online 12 October 2020

0009-3084/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

APÊNDICE C- ANTIFUNGAL EFFECT OF LIPOSOMAL α -BISABOLOL AND WHEN ASSOCIATED WITH FLUCONAZOLE.



Article

Antifungal Effect of Liposomal α -Bisabolol and When Associated with Fluconazole

Camila F. Bezerra ¹, José Geraldo de A. Júnior ², Rosilaine de L. Honorato ³, Antonia Thassya L. dos Santos ³, Josefa Carolaine P. da Silva ³, Taís G. da Silva ³, Thiago S. de Freitas ⁴, Thiago Adler T. Vieira ¹, Maria Clara E. Bezerra ⁵, Débora Lima Sales ⁴, João Pedro V. Rodrigues ², José M. Barbosa Filho ⁶, Laisla R. Peixoto ⁶, Allyson P. Pinheiro ³, Henrique D. M. Coutinho ^{4,*}, Maria Flaviana B. Moraes-Braga ³ and Teresinha G. da Silva ⁷

¹ Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco-UFPE, Recife 50732-970, Brazil; camilawasidi@gmail.com (C.F.B.); thiago.a.t.vieira@gmail.com (T.A.T.V.)

² Department of Pharmacy, Federal University of Ceará-UFCE, Fortaleza 60455-900, Brazil; junioralencar727@gmail.com (J.G.d.A.J.); jpedroviana@alu.ufc.br (J.P.V.R.)

³ Department of Biological Sciences, Regional University of Cariri-URCA, Crato 63105-010, Brazil; rosilainehonorato@gmail.com (R.d.L.H.); thassyalucas@hotmail.com (A.T.L.d.S.); carolbio1881@outlook.com (J.C.P.d.S.); taigustmac96@gmail.com (T.G.d.S.); allysson.ponheiro@urca.br (A.P.P.); flavianamoraesb@yahoo.com.br (M.E.B.M.-B.)

⁴ Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri-URCA, Crato 63105-010, Brazil; thiagocrato@hotmail.com (T.S.d.F.); debora.lima.sales@gmail.com (D.L.S.)

⁵ Faculty of Medicine of Juazeiro do Norte-Estácio FMJ, Juazeiro do Norte 63047-045, Brazil; clara-f-b@hotmail.com

⁶ Department of Pharmacy, Federal University of Paraíba-UFPB, João Pessoa 58051-900, Brazil; jbarbosa@lft.ufpb.br (J.M.B.F.); laislar@hotmail.com (L.R.P.)

⁷ Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco-UFPE, Recife 50732-970, Brazil; teresinha100@gmail.com

* Correspondence: hdmcoutinho@gmail.com; Tel: +55-(88)-3102-1204



Citation: Bezerra, C.F.; Júnior, J.G.d.A.; Honorato, R.d.L.; Santos, A.T.L.d.; Silva, J.C.P.d.; Silva, T.G.d.; Freitas, T.S.d.; Vieira, T.A.T.; Bezerra, M.C.E.; Lima Sales, D.; et al. Antifungal Effect of Liposomal α -Bisabolol and When Associated with Fluconazole. *Cosmetics* 2021, 8, 28. <https://doi.org/10.3390/cosmetics8020028>

Academic Editor: Eliana B. Souto

Received: 27 February 2021

Accepted: 21 March 2021

Published: 2 April 2021

Abstract: Fungal pathologies caused by the genus *Candida* have increased in recent years due to the involvement of immunosuppressed people and the advance of resistance mechanisms acquired by these microorganisms. Liposomes are nanovesicles with lipid bilayers in which they store compounds. α -Bisabolol is a sesquiterpene with proven biological activities, and in this work it was tested alone in liposomes and in association with Fluconazole in vitro to evaluate the antifungal potential, Fluconazole optimization, and virulence inhibitory effect in vitro. Antifungal assays were performed against standard strains of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, and *Candida krusei* by microdilution to identify the IC₅₀ values and to obtain the cell viability. The Minimum Fungicidal Concentration (MFC) was performed by subculturing on the solid medium, and at their subinhibitory concentration (Matrix Concentration (MC): 16,384 μ g/mL) (MC/16), the compounds, both isolated and associated, were associated with Fluconazole to evaluate the inhibitory effect of this mixture.