



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ISABELA MAZARIM DA COSTA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE EMULSÃO
CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE PRATA BIOGÊNICAS E ÓLEOS
ESSENCIAIS DE *Origanum vulgare* e *Melaleuca alternifolia*, COMO
POTENCIAL TRATAMENTO PARA A PITIRÍASE VERSICOLOR**

Londrina
2023

ISABELA MAZARIM DA COSTA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE EMULSÃO
CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE PRATA BIOGÊNICAS E ÓLEOS
ESSENCIAIS DE *Origanum vulgare* e *Melaleuca alternifolia*, COMO
POTENCIAL TRATAMENTO PARA A PITIRÍASE VERSICOLOR**

Dissertação de mestrado apresentada à
Universidade Estadual de Londrina - UEL, como
requisito parcial para a obtenção do título de
Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Audrey Alesandra
Stinghen Garcia Lonni.

Coorientador: Prof. Dr. Luciano Aparecido
Panagio.

Londrina
2023

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

C837d Costa, Isabela Mazarim da Costa.

Desenvolvimento e caracterização de emulsão contendo nanopartículas de prata biogênicas e óleos essenciais de *Origanum vulgare* e *Melaleuca alternifolia*, como potencial tratamento para a Pitíriase versicolor / Isabela Mazarim da Costa. - Londrina, 2023.
105 f. : il.

Orientador: Audrey Alesandra Stingham Garcia Lonni.

Coorientador: Luciano Aparecido Panagio.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2023.

Inclui bibliografia.

1. Pitíriase versicolor - Tese. 2. Formulações farmacêuticas - Tese. 3. Óleos essenciais - Tese. 4. Nanopartículas de prata - Tese. I. Lonni, Audrey Alesandra Stingham Garcia. II. Panagio, Luciano Aparecido. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. IV. Título.

CDU 61

ISABELA MAZARIM DA COSTA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE EMULSÃO
CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE PRATA BIOGÊNICAS E ÓLEOS
ESSENCIAIS DE *Origanum vulgare* e *Melaleuca alternifolia*, COMO
POTENCIAL TRATAMENTO PARA A PITIRÍASE VERSICOLOR**

Dissertação de mestrado apresentada à
Universidade Estadual de Londrina - UEL,
como requisito parcial para a obtenção do
título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Audrey Alesandra Stinghen Garcia
Lonni - Orientadora
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Raquell De Castro Chaves Asfor
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dra. Sara Scandorieiro
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 24 de novembro de 2023.

DEDICATÓRIA

A Deus e aos meus pais,
Maria Lucilene e Pedro Luiz.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, e por ter me amparado em todos os momentos até aqui.

À Professora Audrey Alesandra Stinghen Garcia Lonni pelo apoio incondicional para a execução desse projeto, por todos os conselhos, todos os momentos de alegria e por ter me aceitado como orientanda mesmo não me conhecendo pessoalmente. Agradeço imensamente pela oportunidade, por sempre me incentivar e por toda disponibilidade em me ajudar em todos os momentos.

Ao Professor Luciano Aparecido Panagio que também confiou a mim a execução deste projeto, não medindo esforços para me ajudar no laboratório de microbiologia. Agradeço por toda compreensão, aconselhamentos, orientação e pela amizade.

Aos meus pais, Maria Lucilene Mazarim da Costa e Pedro Luiz da Costa, por sempre acreditarem em mim e se esforçarem para fazer tudo o que podem pelos meus estudos. Agradeço pelo apoio e amor incondicional, desde o processo de seleção até o término desse grande projeto em minha vida. Obrigada pelos conselhos, orações, pela educação e pelo incentivo financeiro para que eu pudesse realizar mais um sonho em minha vida. Nunca mediram esforços para me ver feliz. Vocês me ensinaram a ter garra, determinação e coragem para sempre atingir meus objetivos.

À minha irmã, Mariana Mazarim da Costa, que sempre esteve ao meu lado nos momentos bons e ruins, me ajudando e me aconselhando. Nunca me deixou desistir, sempre me apoiou a alçar projetos maiores em minha vida, e acreditou junto comigo que eu iria concluir o tão sonhado mestrado em cosmetologia.

Ao meu companheiro, Vanderley Ruffino de Souza Júnior, pelo apoio e amor que tem por mim. Desde o início me incentivou a buscar o melhor para minha vida, e nunca mediu esforços para que eu concluísse meu mestrado. Sempre me aconselhou, me encorajou mesmo distante, e me mostrou que eu era capaz de concluir independente da saudade. Com você sou mais feliz e me sinto segura em alçar voos mais altos.

Aos meus avós, Primo Mazarim (*in memoriam*), Aparecida Buqui e Izabel Francisca da Costa, por todas as orações, conselhos e momentos que

passamos juntos. Obrigada por estarem sempre presentes em minha vida e me guiando.

Aos meus amigos de laboratório de microbiologia, Diego Henrique Morandi, Noele Caroline Alves, Guilherme Fonseca Reis, César Guilherme Matias, Ana Maria Heinzen, Maria Gabriela Reis, Tatiana Borges, Lucas Medeiros e Carlos Eduardo Bueno, por sempre me auxiliarem no laboratório e por não medirem esforços para me ajudar a executar as técnicas de microbiologia. Sem vocês, não conseguiria concluir esse trabalho. Obrigada a todos vocês pela atenção, companheirismo e amizade.

Aos meus colegas, professores e técnicos do NIP3, NIP5, LABITEC e LMEM por sempre serem solícitos comigo, me ajudando em todas dúvidas e auxílio para a execução desse projeto. Vocês foram essenciais em minha formação.

Às minhas amigas do laboratório LABITEC, Ana Júlia Gaioto, Sara Scandorieiro, Ana Carolina Tribulato, Thays Bergamini, Débora Dahmer, Briani Bigotto, Vitória Dinardo, Nádia Urasaki, Letícia Nakao, Bruna Rosa, Camila Harumi, Giovana Schumacher, Mariana Arrevolti e Marina Martins, por serem sempre solícitas para comigo, me ajudando em todos os momentos. Obrigada pelos momentos de trabalho e os momentos de descontração que tivemos. Vocês são especiais para mim e tornaram meus dias mais alegres.

Às minhas amigas Kawany Forato, Noele Caroline Alves, Ana Maria Heinzen e Tatiana Borges, que estiveram comigo desde o início da minha caminhada em Londrina. Obrigada pelas risadas, conselhos, orações, parcerias e por sempre estarem comigo nos momentos felizes e tristes. Com vocês, tudo ficou mais leve e alegre e me deram forças para continuar na caminhada.

Às minhas amigas, Carine Hachenhaar e Bruna Moura pela amizade mesmo distante nesses anos que morei em Londrina, pelos conselhos e forças que me deram para concluir mais uma etapa em minha vida. Obrigada por estarem presentes em minha vida desde muitos anos atrás, me animando e me ajudando sempre que preciso. Vocês são valiosas para mim.

Ao Guilherme Leal pela doação das matérias-primas para o desenvolvimento das formulações desse trabalho.

À Fundação Araucária pela bolsa de fomento.

“Se você quer desenvolver coragem, faça aquilo que você teme e faça-o repetidamente até que você consiga um número de experiências bem-sucedidas. Essa é a maneira mais rápida e certa já descoberta para superar o medo.”

(Dale Carnegie)

RESUMO

COSTA, Isabela Mazarim da. **Desenvolvimento e caracterização de emulsão contendo nanopartículas de prata biogênicas e óleos essenciais de *Origanum vulgare* e *Melaleuca alternifolia*, como potencial tratamento para a pitiríase versicolor.** 2023. 105 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

A Pitiríase versicolor (PV) é uma infecção fúngica superficial caracterizada por um distúrbio de pigmentação cutânea, ocasionada por leveduras lipofílicas do gênero *Malassezia* spp. A PV se manifesta por máculas ovais hiper ou hipopigmentadas em regiões muito oleosas da pele, tornando-se esteticamente desagradável. Os fatores de ocorrência da PV podem ser endógenos ou exógenos, e os tratamentos convencionais são por meio de agentes antifúngicos tópicos e orais, mas frequentemente tópicos. No entanto, tais tratamentos são onerosos, longos, com efeitos colaterais, além de apresentarem resistência ao fungo e reincidência da PV. O objetivo do estudo foi desenvolver e caracterizar uma emulsão hidratante do tipo O/A, contendo nanopartículas de prata biogênicas (bioAgNP) e óleos essenciais de *Origanum vulgare* (OEO) e *Melaleuca alternifolia* (OEM) como potencial tratamento para PV. Inicialmente foi avaliada a atividade antifúngica dos ativos individuais contra *Malassezia pachydermatis* por meio dos ensaios de Disco-difusão, Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Fungicida Mínima (CFM) e *Checkerboard*. Posteriormente, foram desenvolvidas oito formulações, sendo uma base (F_{base}) e sete de tratamento seguindo o planejamento experimental do tipo Centróide-Simplex formado por um triângulo equilátero. Os vértices do triângulo representam as formulações F_{OEM} , $F_{bioAgNP}$ e F_{OEO} , desenvolvidas com 3% de OEM, 3% de bioAgNP e 2% de OEO, respectivamente. Já as arestas, representam as formulações com ativos combinados na proporção 1:1, sendo elas $F_{OEM;bioAgNP}$, $F_{OEO;bioAgNP}$ e $F_{OEM;OEO}$. Por fim, o ponto central do triângulo equilátero representa a formulação em combinação ternária (1:1:1) dos ativos, codificada por $F_{OEM;bioAgNP;OEO}$. As características farmacotécnicas foram avaliadas por ensaios organolépticos e físico-químicos, e testes de pré-estabilidade e estabilidade preliminar. Por fim, a eficácia antifúngica das formulações foi avaliada pelo ensaio de curva de sobrevivência e análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) contra *M. pachydermatis*. Os ativos OEO, OEM e bioAgNP apresentaram ação antifúngica contra *M. pachydermatis* e todas as formulações apresentaram características organolépticas e físico-químicas adequadas. No teste de estabilidade preliminar, a formulação $F_{OEM;bioAgNP;OEO}$ foi descartada devido à instabilidade da cor. Das formulações com ativos, $F_{bioAgNP}$ apresentou a melhor espalhabilidade quando comparado a base, além de ser a única formulação a apresentar diferença significativa em termos de espalhabilidade pela ANOVA com posterior teste de Tukey ($p < 0.05$). Em relação aos parâmetros de pH e espalhabilidade, $F_{bioAgNP}$ é a formulação mais próxima da F_{base} , evidenciado pela análise estatística dendograma por distância Euclidiana, e que ambas se diferem das demais. Das sete formulações desenvolvidas com os bioativos, apenas $F_{bioAgNP}$ 3% foi selecionada como potencial alternativa terapêutica antifúngica no tratamento da Pitiríase versicolor. $F_{bioAgNP}$ 3% apresentou atividade antifúngica contra *M. pachydermatis* pelos testes de curva de sobrevivência e microscopia eletrônica de varredura (MEV). A avaliação da eficácia antifúngica de $F_{bioAgNP}$ pela técnica de curva de sobrevivência, $F_{bioAgNP}$ apresentou diferença estatística após 0.5 h ($p < 0.05$). Já o

cetoconazol usado como controle do teste, apresentou diferença estatística após 8 h. Das sete formulações com bioativos, apenas F_{bioAgNP} 3% foi selecionada como potencial alternativa terapêutica antifúngica no tratamento da PV.

Palavras-chave: Pitiríase versicolor; *Malassezia pachydermatis*; Nanopartículas de prata; *Origanum vulgare*; *Melaleuca alternifolia*; Formulações

ABSTRACT

COSTA, Isabela Mazarim da. **Development and characterization of an emulsion containing biogenic silver nanoparticles and essential oils of *Origanum vulgare* and *Melaleuca alternifolia*, as a potential treatment for pityriasis versicolor.** 2023. 105 p. Dissertation (Master's in Pharmaceutical Sciences) – State University of Londrina, Londrina, 2023.

Pityriasis versicolor (PV) is a superficial fungal infection characterized by a skin pigmentation disorder, caused by lipophilic yeasts of the genus *Malassezia* spp. PV manifests itself as hyper- or hypopigmented oval macules in very oily regions of the skin, making it aesthetically unpleasant. The factors for the occurrence of PV can be endogenous or exogenous, and conventional treatments are through topical and oral antifungal agents, but often topical. However, such treatments are expensive, long, with side effects, in addition to presenting resistance to the fungus and recurrence of PV. The objective of the study was to develop and characterize an O/W moisturizing emulsion, containing biogenic silver nanoparticles (bioAgNP) and essential oils from *Origanum vulgare* (OEO) and *Melaleuca alternifolia* (OEM) as a potential treatment for PV. Initially, the antifungal activity of individual active ingredients against *Malassezia pachydermatis* was evaluated using Disk Diffusion, Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Fungicide Concentration (CFM) and *Checkerboard*. Subsequently, eight formulations were developed, one base (Fbase) and seven treatment formulations following the Centroid-Simplex experimental design formed by an equilateral triangle. The vertices of the triangle represent the FOEM, FbioAgNP and FOEO formulations, developed with 3% OEM, 3% bioAgNP and 2% OEO, respectively. The edges represent the formulations with active ingredients combined in a 1:1 ratio, namely FOEM;bioAgNP, FOEO;bioAgNP and FOEM;OEO. Finally, the central point of the equilateral triangle represents the ternary combination formulation (1:1:1) of the assets, coded by FOEM;bioAgNP;OEO. The pharmacotechnical characteristics were evaluated by organoleptic and physicochemical tests, and pre-stability and preliminary stability tests. Finally, the antifungal efficacy of the formulations was evaluated by survival curve and Scanning Electron Microscopy (SEM) assay against *M. pachydermatis*. The active ingredients OEO, OEM and bioAgNP showed antifungal action against *M. pachydermatis* and all formulations presented adequate organoleptic and physicochemical characteristics. In the preliminary stability test, the FOEM;bioAgNP;OEO formulation was discarded due to color instability. Of the formulations with active ingredients, FbioAgNP presented the best spreadability when compared to the base, in addition to being the only formulation to present a significant difference in terms of spreadability by ANOVA with subsequent Tukey test ($p < 0.05$). In relation to the pH and spreadability parameters, FbioAgNP is the closest formulation to Fbase, evidenced by the statistical analysis dendrogram by Euclidean distance, and that both differ from the others. Of the seven formulations developed with bioactives, only FbioAgNP 3% was selected as a potential antifungal therapeutic alternative in the treatment of Pityriasis versicolor. FbioAgNP 3% showed antifungal activity against *M. pachydermatis* by survival curve and scanning electron microscopy (SEM) tests. When evaluating the antifungal efficacy of FbioAgNP using the survival curve technique, FbioAgNP showed a statistical difference after 0.5 h ($p < 0.05$). Ketoconazole, used as test control, showed a statistical difference after 8 hours. Of the seven formulations with bioactives, only FbioAgNP 3% was selected as a

potential antifungal therapeutic alternative in the treatment of PV.

Keywords: Pityriasis versicolor; *Malassezia pachydermatis*; Silver nanoparticles; *Origanum vulgare*; *Melaleuca alternifolia*; Formulations.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Histologia da pele e suas camadas: epiderme, derme e hipoderme.	25
Figura 2 - Pitiríase versicolor. A) Máculas hiperpigmentadas no dorso, e B) Máculas hipopigmentadas.	28
Figura 3 - Exame pelo sinal de Zireli em paciente com PV. A) PV antes do exame, B) PV durante o exame de "evoked-skin" e C) PV após o exame.	28
Figura 4 - <i>Malassezia</i> spp. vistas por microscopia óptica (indicadas pelas setas pretas), em uma porção de raspado de pele de paciente contendo PV inserida em solução de KOH.	29
Figura 5 – Epiderme analisada para diagnóstico de PV. Abundantes hifas e esporos presentes no estrato córneo, juntamente com cristas epidérmicas achatadas (PAS 200x – Figura A). Observou-se diminuição das fibras elásticas finas na derme papilar (seta – Figura B) e das fibras fragmentadas na derme reticular superficial, além de ectasia vascular (Orceína 100x).....	30
Figura 6 - Mecanismos de ação de fármacos antifúngicos comumente utilizados para tratamento das infecções fúngicas no corpo humano.	33
Figura 7 - Representação do sistema de um emulsificante, o qual é composto por um tensoativo, molécula com uma cabeça hidrofílica e uma cauda lipofílica.	34
Figura 8 - Tipos de emulsões: simples 1) óleo em água (O/A), 2) água em óleo (A/O) ;e múltiplas 3) água em óleo em água (A/O/A) e 4) óleo em água em óleo (O/A/O).	34
Figura 9 - Exemplificação das emulsões: 1) Água em óleo (A/O) e 2) Óleo em água (O/A).....	35
Figura 10 - Representação da planta da espécie <i>Origanum vulgare</i>	38
Figura 11 - Estruturas químicas dos monoterpenoides presentes no óleo essencial de orégano (<i>Origanum vulgare</i>).	38
Figura 12 - Representação das folhas da árvore <i>Melaleuca alternifolia</i>	40
Figura 13 - Estrutura química dos principais componentes isolados do óleo essencial de melaleuca (<i>Melaleuca alternifolia</i>).	41
Figura 14 - Representação de mecanismos de ação de óleos essenciais com propriedades antimicrobianas contra uma célula fúngica.....	42
Figura 15 – Métodos gerais de obtenção de nanopartículas metálicas, pelas abordagens “ <i>Bottom-up</i> ” e “ <i>Top-down</i> ”.	45
Figura 16 – Representação dos processos de síntese verde ou biológica de	

nanopartículas metálicas: Possíveis matérias-primas que favorecem a redução do metal, processo de produção das NPs, fatores que afetam a biossíntese e diferentes formas e tamanhos de NPs produzidas.	47
Figura 17 - Mecanismos de síntese biológica de nanopartículas de prata utilizando um fungo filamentosos como precursor de biomassa fúngica.	49
Figura 18 - Mecanismo de redução da prata baseado na presença da enzima nitrato redutase.	50
Figura 19 - Mecanismo de ação de nanopartículas metálicas biogênicas contra células fúngicas.	51
Figura 20 - Planejamento experimental do tipo Centroides-Simplex modificado com três ativos (OEO, OEM e bioAgNP) para a escolha da melhor formulação.	58
Figura 21 – Mudança de coloração observada pela redução de Ag^+ em Ag^0 , resultando em formação das bioAgNP, utilizando extrato fúngico de <i>L. ornata</i> como agente redutor.	66
Figura 22 - Gráfico de detecção por espectrofotometria no UV-Vis das bioAgNP sintetizadas por <i>L. ornata</i> . O pico de absorvância em 410 nm indica a obtenção de bioAgNP.	68
Figura 23 - Espectroscopia por FTIR das bioAgNP sintetizadas a partir de <i>L. ornata</i>	71
Figura 24 - Curva padrão determinada com soluções de $AgNO_3$ (mM) (padrão) para determinar a concentração das bioAgNP. A correlação das soluções padrão e a amostra contendo bioAgNP, resulta em uma reta pelo método de regressão linear que determinou a concentração das bioAgNP em 4,65 mM.	72
Figura 25 – Resultados visuais da inibição de crescimento do contato dos ativos antifúngicos individuais com a cepa de <i>M. pachydermatis</i>	73
Figura 26 – Avaliação organoléptica das formulações desenvolvidas em triplicata.	78
Figura 27 - Avaliação organoléptica das formulações após os 15 dias de avaliação da estabilidade preliminar.	80
Figura 28 – Espalhabilidade das formulações no tempo zero (T_0) e após 15 dias no ciclo por estresse térmico (T_{15}). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0.05$) pelo teste Tukey.	82
Figura 29 - Dendograma por distancia Euclidiana das propriedades (pH e espalhabilidade) das formulações. As cores indicam os grupos (clusters) que foram formados de acordo com o nível de similaridade.	83

Figura 30 - Curva de sobrevivência da cepa *M. pachydermatis*, exposta às formulações desenvolvidas (F_{base} , FOEM, $F_{bioAgNP}$, FOEO, FOEM;bioAgNP, FOEO;bioAgNP e FOEM;OEO) e ao cetoconazol comercial.85

Figura 31 - Micrografias obtidas por MEV de *M. pachydermatis*. A1 e A2 são micrografias da morfologia leveduriforme tratada com F_{base} . B1, B2, C1 e C2 são morfologias leveduriformes tratadas com $F_{bioAgNP}$ 3 %.87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descritivo das matérias-primas utilizadas nas formulações, suas respectivas fases, denominação comercial, INCI name, função e fornecedor.	59
Tabela 2 - Composição de sete formulações de emulsão contendo OEO, OEM e bioAgNP, isoladamente e/ou em associação e uma formulação base (F_{base}), que foi isenta de ativos.	60
Tabela 3 – Valor médio da concentração inibitória mínima (CIM) e fungicida mínima (CFM) dos ativos individuais (OEO, OEM e bioAgNP) contra <i>M. pachydermatis</i>	74
Tabela 4 – Concentração Inibitória Mínima em combinação ($CIM_{combinação}$), índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) e interação dos ativos OEO, OEM e bioAgNP, observados pelo ensaio de combinação (Checkerboard).	75
Tabela 5 – Características organolépticas e propriedades físico-químicas observadas após 24 h de manipulação das formulações desenvolvidas.	78
Tabela 6 – Estabilidade preliminar das formulações, onde foram analisados os parâmetros de cor, odor, aspecto, pH e densidade, após 15 dias em temperatura ambiente e 15 dias sob ciclo estresse térmico.	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/O	Emulsão do tipo água em óleo
A/O/A	Emulsão do tipo água em óleo em água
O/A	Emulsão do tipo óleo em água
O/A/O	Emulsão do tipo água óleo em água em óleo
Ag	Prata
AgNO ₃	Nitrato de prata
AgNPs	Nanopartículas de prata
AIDS	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
bioAgNP	Nanopartículas de prata biogênicas
BHT	Butilhidroxitolueno
Ca ²⁺	Íons de Cálcio
CLSI	Clinical Laboratory Standarts Institute
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIF	Concentração Inibitória Fracionada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CM	Centímetros cúbicos
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
EC	Etrato córneo
EE	Etrato Espinhoso
EG	Etrato Granuloso
EHL	Equilíbrio hidrofílico lipofílico
EL	Etrato Lúcido
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
F _{base}	Formulação base (sem ativos)
F _{OEM}	Formulação contendo 3,0 % (v/p) de OEM
F _{bioAgNP}	Formulação contendo 3,0 % (v/p) de bioAgNP
F _{OEO}	Formulação contendo 2,0 % (v/p) de OEO
F _{OEM;bioAgNP}	Formulação contendo 1,5 % (v/p) de OEM e bioAgNP
F _{OEO;bioAgNP}	Formulação contendo 1,0 % (v/p) de OEO e 1,5 % de bioAgNP

F _{OEM;OEO}	Formulação contendo 1,5 % (v/p) de OEM e 1,0 % de OEO
F _{OEM;bioAgNP;OEO}	Formulação contendo 1,0 % (v/p) de OEM, 1,0 % de bioAgNP e 0,67% de OEO
K ⁺	Íons de Potássio
KOH	Hidróxido de potássio
Mg ²⁺	Íons de Magnésio
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
NPs	Nanopartículas metálicas
NO ₃ ⁻	Íons Nitrato
NO ₂ ⁻	Íons Nitrito
OEs	Óleos Essenciais
OEO	Óleo Essencial de <i>Origanum vulgare</i>
OEM	Óleo Essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i>
PAS	Ácido Periódico de Schiff
PV	Pitiríase versicolor
pH	Potencial Hidrogeniônico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	24
2.1 PELE.....	24
2.1.1 Histologia e Anatomia da Pele.....	24
2.1.2 Microbiota Cutânea.....	25
2.2 PITIRÍASE VERSICOLOR: CAUSAS E EPIDEMIOLOGIA.....	26
2.3 MICOSES E TRATAMENTOS.....	31
2.4 FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS.....	33
2.4.1 Sistemas de Emulsões.....	33
2.5 ATIVOS ANTIMICROBIANOS.....	35
2.5.1 Óleos Essenciais.....	35
2.5.1.1 Óleo essencial de Orégano.....	37
2.5.1.2 Óleo essencial de Melaleuca.....	39
2.5.1.3 Mecanismos de ação antifúngica de óleos essenciais.....	41
2.5.2 Nanopartículas de Prata.....	43
2.5.2.1 Biossíntese de nanopartículas de prata.....	45
2.5.2.2 Mecanismos de ação de nanopartículas de prata biogênicas.....	50
3. OBJETIVOS.....	52
3.1 OBJETIVO GERAL.....	52
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	52
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
4.1 OBTENÇÃO DOS BIOATIVOS.....	53
4.1.1 Óleos Essenciais.....	53
4.1.2 Síntese das Nanopartículas de Prata Biogênicas (bioAgNP).....	53
4.1.2.1 Caracterização das bioAgNP.....	53
4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ANTIMICROBIANOS.....	55
4.2.1 Cultivo do Microrganismo.....	55
4.2.2 Efeito Antifúngico dos Ativos Individuais pelo Ensaio de Disco-difusão.....	55

4.2.3	Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos Antimicrobianos.....	56
4.2.4	Avaliação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos Antimicrobianos.....	56
4.2.5	Interação Antifúngica dos Antimicrobianos em Combinações Binárias.....	57
4.3	DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES.....	58
4.4	CARACTERIZAÇÃO FARMACOTÉCNICA DAS FORMULAÇÕES.....	61
4.4.1	Análise de Pré-Estabilidade (Centrifugação).....	61
4.4.2	Avaliação da Estabilidade Preliminar das Formulações.....	61
4.4.3	Análise Organoléptica.....	62
4.4.4	Ensaio Físico-Químico.....	62
4.4.4.1	Determinação do potencial hidrogeniônico (pH).....	62
4.4.4.2	Determinação da densidade.....	63
4.4.4.3	Determinação da espalhabilidade.....	63
4.5	AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA ANTIFÚNGICA DAS FORMULAÇÕES.....	64
4.5.1	Curva de Sobrevivência.....	64
4.5.2	Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura.....	64
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	65
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
5.1	OBTENÇÃO DAS BIOAGNP.....	66
5.1.1	Síntese das bioAgNP.....	66
5.1.2	Caracterização das bioAgNP.....	67
5.1.2.1	Detecção por espectrofotometria no UV-Vis.....	67
5.1.2.2	Espalhamento dinâmico da luz (DLS) e potencial zeta.....	69
5.1.2.3	Espectroscopia na região do Infravermelho por transformada de fourier (FTIR).....	70
5.1.2.4	Fluorescência de raios X por dispersão de energia (EDXRF).....	71
5.2	AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA ANTIFÚNGICA DOS ANTIMICROBIANOS.....	72
5.2.1	Efeito Antifúngico dos Ativos Individuais pelo Ensaio de Disco-difusão.....	72
5.2.2	Avaliação de CIM e CFM dos Antimicrobianos Individualmente.....	74
5.2.3	Interação Antifúngica dos Antimicrobianos em Combinações	

Binárias.....	75
5.3 CARACTERIZAÇÃO FARMACOTÉCNICA DAS FORMULAÇÕES.....	77
5.3.1 Teste de pré-estabilidade, ensaios organolépticos e físico-químicos.....	77
5.3.1.1 Teste de centrifugação.....	77
5.3.1.2 Características organolépticas.....	77
5.3.1.3 Avaliação de estabilidade preliminar, ensaios organolépticos e físico-químicos.....	79
5.3.1.4 Determinação da espalhabilidade.....	81
5.4 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA ANTIFÚNGICA DAS FORMULAÇÕES.....	84
5.4.1 Curva de Sobrevivência.....	84
5.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	86
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	89
ANEXOS.....	90
ANEXO A.....	91
ANEXO B.....	92
ANEXO C.....	93
REFERÊNCIAS.....	94

1 INTRODUÇÃO

A Pitiríase versicolor (PV), conhecida popularmente como pano branco, é considerada uma infecção fúngica superficial, caracterizada por um distúrbio de pigmentação cutânea, causada por espécies de leveduras lipofílicas do gênero *Malassezia* spp. (Santana; Azevedo; Campos Filho, 2013; Gharehbolagh *et al.*, 2019). Ocorre mundialmente, sendo mais incidente em regiões tropicais (regiões mais quentes e úmidas), chegando até 50%, se comparada com países Escandinavos que corresponde a 1%. (Rodoplu *et al.*, 2014; Chebil *et al.*, 2022). Acomete pessoas de ambos os sexos e de todas as faixas etárias, sobretudo, é predominante em adolescentes e adultos jovens devido à alta produção de sebo nessa idade (Fariña-González *et al.*, 2019; Khattab; Omran, 2020; Chebil *et al.*, 2022).

A PV manifesta-se classicamente por máculas irregulares (redondas até ovais), finas e descamativas, podendo ser hiperpigmentadas, hipopigmentadas ou eritematosas (por isso “versicolor” no nome). O diagnóstico da PV normalmente é realizado pelo exame físico a fim de observar aspecto escamoso da pele. Porções raspadas da pele em hidróxido de potássio (KOH), pode ser usada para confirmar a presença de hifas e blastoconídeos esféricos característicos de *Malassezia* spp por observação microscópica. Geralmente, as manchas são distribuídas pelo pescoço, rosto, parte superior do tronco e extremidades superiores proximais, visto que são áreas com maior número de glândulas sebáceas (Hudson; Sturgeon; Peiris, 2018; Alberdi; Gómez, 2020; Macedo; Freitas, 2021; Chebil *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2022; Varsha *et al.*, 2023).

Há vários fatores endógenos e exógenos responsáveis pela ocorrência da PV. Os endógenos são predisposição genética, distúrbios endócrinos, uso de corticóides, uso de contraceptivos orais, gravidez e síndrome da deficiência imunológica adquirida. Já os fatores exógenos são o clima quente e umidade, ocasionando a hiperoleosidade, além da oclusão da pele por roupas ou cosméticos inadequados que alteram a microflora e o pH cutâneo. Sobretudo, a hiperidrose é o fator predisponente mais importante para a manifestação da PV (Lima *et al.*, 2002; Alberdi; Gómez, 2020).

Geralmente a PV é assintomática, embora algumas pessoas possam manifestar leve prurido, e recorrente. A maior preocupação e questionamento dos pacientes referente à aparência estética desagradável da pele, impactando

diretamente na qualidade de vida, tanto para saúde física quanto mental, dos mesmos. (Gupta; Foley, 2015; Renati; Cukras; Bigby, 2015; Wang *et al.*, 2020). A resposta ao tratamento é variável. Apesar da maioria dos pacientes ter uma boa resposta, a recorrência da PV é frequente. A maior preocupação dos pacientes é a hipopigmentação ou hiperpigmentação associada à erupção frequente, mesmo após o tratamento independente da imunidade (Renati; Cukras; Bigby, 2015; Romero-Sandoval *et al.*, 2017).

Antifúngicos tópicos são normalmente utilizados para tratamento da PV e a aplicação dos agentes tópicos pode variar entre 1 a 4 semanas. O tratamento tópico usual ocorre por meio de cremes, géis, loções, shampoos e sprays incorporados com compostos azólicos como miconazol, cetoconazol, clotrimazol ou oxiconazol (Gupta; Lyons, 2014; TelessaúdeRS-UFRGS, 2019), ou por ativos como sulfeto de selênio e piritionato de zinco (Hudson; Sturgeon; Peiris, 2018). Antifúngicos sistêmicos (orais) podem ser utilizados em casos de recorrência da infecção (Li *et al.*, 2021).

A recorrência da PV é comum de acontecer por haver falha no tratamento. Múltiplas aplicações dos agentes tópicos por semanas ou meses, tratamentos onerosos e resistência aos antifúngicos, resultam na reincidência da PV. Além disso, efeitos colaterais pelo uso dos antifúngicos sistêmicos podem ocorrer, como por exemplo o risco de toxicidade hepática pelo uso longo de cetoconazol e interações com outras drogas. Devido a essas considerações, faz-se necessário encontrar novas estratégias antifúngicas alternativas para o tratamento futuro da PV (Gupta; Lyons, 2014; Cetoconazol, 2018; Alberdi; Gómez, 2020).

Uma nova alternativa para a PV pode ser a utilização de óleos essenciais (OEs) extraídos de plantas, que apresentam compostos com propriedades antimicrobianas, como os fenóis e terpenos (Kalemba; Kunicka, 2003), e nanopartículas metálicas com propriedades antimicrobianas, como as de prata (Morandi, 2023; Scandorieiro *et al.*, 2023).

O óleo essencial (OE) de orégano da espécie *Origanum vulgare* (OEO) e o OE de melaleuca da espécie *Melaleuca alternifolia* (OEM), possuem, dentre suas diversas propriedades, a atividade antimicrobiana. Os principais compostos com atividade antimicrobiana presentes nesses óleos são os fenóis carvacrol e timol no OEO, e os terpenos terpinen-4-ol e γ -terpineno no OEM. Além disso, o OEM vem sendo estudado contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Souza *et al.*,

2013).

As nanopartículas de prata (AgNPs), desde os tempos antigos, são conhecidas como agentes antimicrobianos eficazes de amplo espectro contra bactérias e fungos, tornando-se uma boa alternativa para combater espécies resistentes formadoras de biofilmes, como *Candida* spp., *Malassezia* spp., *Cryptococcus* spp., dentre outras (Figueredo; Cafarchia; Otranto, 2013; Nakazato *et al.*, 2020; Fonseca *et al.*, 2022).

Considerando as causas e ocorrências da PV, juntamente com a dificuldade de tratamento da mesma, essa revisão tem como objetivo descrever as potenciais aplicações dos óleos essenciais OEO e OEM, e das AgNPs, como sugestões de tratamento para essa dermatite.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PELE

2.1.1 Histologia e Anatomia da pele

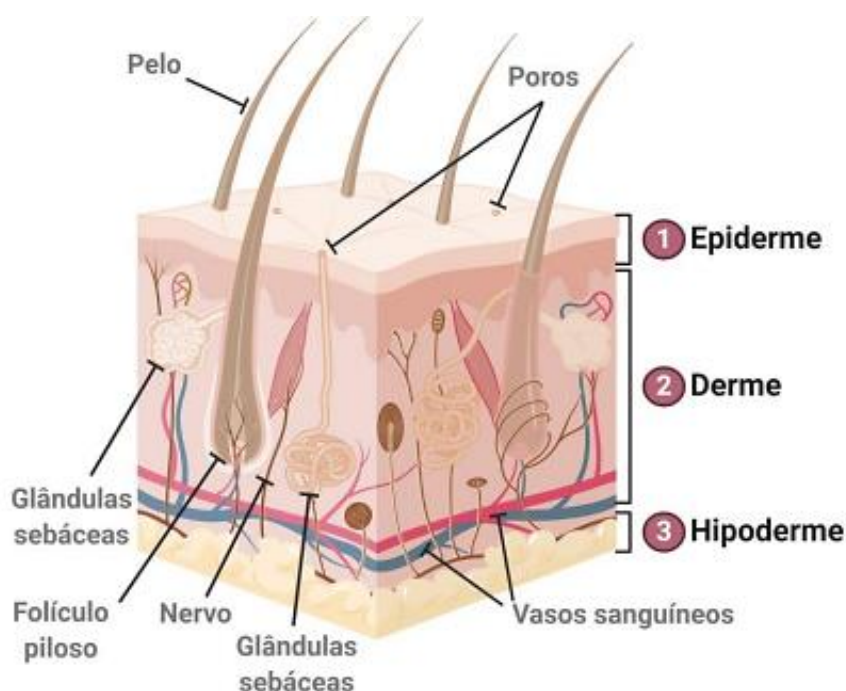
A pele é considerada o maior órgão do corpo humano, possuindo uma área superficial extensa de 1,5 a 2,0 m² que recobre todo o corpo, e representa cerca de 16% do peso corporal. É a camada mais extensa do corpo e desempenha inúmeras funções, principalmente a de proteção entre o organismo e o ambiente exterior. Como primeira linha de defesa, promove uma barreira física no corpo contra uma infinidade de patógenos externos, e contra agressões de danos ambientais (Ciol; Castro, 2019; Almeida, 2020; Chambers; Vukmanovic-Stejic, 2019).

Com uma estrutura complexa de múltiplas camadas, a pele é composta por três principais: epiderme, derme e hipoderme (Figura 1). A camada mais superficial da pele, ou seja, a superior, é a epiderme. Apresenta-se como uma camada fina, com espessura de aproximadamente 0,1 mm, composta majoritariamente por queratinócitos (90 a 95% das células), melanócitos (3%), células de Langerhans (2%) e células de Merkel (0,5%). A camada média da pele, chamada de derme, apresenta-se como uma camada mais espessa (3 a 4 mm), acoplando o tecido de sustentação, o qual atravessa vasos sanguíneos, linfáticos e nervos. Nela, também estão implantados os anexos cutâneos como as glândulas sudoríparas, pêlos, glândulas sebáceas e unhas. Por fim, a última camada é a hipoderme, que consiste em gordura subcutânea e tecido conjuntivo, moldando-se aos músculos adjacentes. (Ciol; Castro, 2019; Almeida, 2020; Chambers; Vukmanovic-Stejic, 2019; Yazdi; Baqersad, 2022).

Tendo em vista que a principal função da pele é formar uma barreira protetora física, química e imunológica entre o corpo e o ambiente externo, a pele sofre diferenciação terminal pelo epitélio estratificado queratinizado (epiderme), a fim de adquirir uma estrutura forte. A epiderme possui camadas estratificadas e autorrenováveis, com a seguinte ordem: estrato córneo (EC), estrato lúcido (EL) onde a pele é mais grossa, estrato granuloso (EG), estrato espinhoso (EE) e estrato germinativo ou basal (EB). Nela, encontram-se variedade de apêndices, como os

folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas (écrinas e apócrinas). Esses apêndices são determinantes para a formação das colônias de bactérias, fungos e vírus que colonizam a pele, tornando a epiderme um abrigo de diversas comunidades de microorganismos (Grice; Dawson, 2017; Tsakovska *et al.*, 2017; Lee; Kim, 2022).

Figura 1 - Histologia da pele e suas camadas: epiderme, derme e hipoderme.



Fonte: Sivieri *et al.*, 2021.

2.1.2 Microbiota Cutânea

O microbioma cutâneo é a junção dos microrganismos e o ambiente circundante. Por ser uma barreira epitelial para o ambiente externo, a pele também suporta uma microbiota diversificada (bactérias, fungos, vírus e microrganismos eucariotos). O corpo humano está totalmente interligado às comunidades de microrganismos que habitam as superfícies do corpo e o ambiente externo, de modo que a microbiota da pele se torna um nicho único, adaptada à vida nos micro-habitats que definem as condições ambientais e nutricionais deste ecossistema. O microbioma comensal é essencial para manter a função de proteção do organismo interno, onde os microrganismos da microbiota normal da pele, participam dos processos

fisiológicos essenciais. Particularmente, o microbioma está presente nas reações físicas, químicas, microbiológicas e imunológicas que mantêm o sistema de função de barreira da pele (Jo; Kennedy; Kong, 2017; Flowers; Grice, 2020; Lee; Kim, 2022).

A superfície cutânea, normalmente, é um ambiente considerado ácido, com alto teor de sal, seco e aeróbico. As relações entre os fatores extrínsecos e intrínsecos geram um microbioma bem controlado e delicadamente equilibrado (Lee; Kim, 2022).

As diversas comunidades de microrganismos estão colonizam a pele de acordo com suas especificidades fisiológicas. Com a interação em conjunto e as mutualísticas ou comensais, com células hospedeiras de mamíferos, a microbiota da pele promove defesa e respostas imunitárias, inibe a colonização e a infecção por microrganismos oportunistas (patógenos), promove reparação tecidual e de barreira cutânea (Flowers; Grice, 2020). Segundo Safady (2021) os estudos da diversidade, taxonomia e do potencial funcional de uma comunidade microbiana coexistindo em um ambiente, ou seja, análises metagenômicas, têm mostrado que a maioria das leituras obtidas de regiões da pele são bacterianas, mas também proporções relativamente altas de fungos ou sequências virais (Jo; Kennedy; Kong, 2017).

Diversas doenças de pele, como dermatite seborreica, dermatite atópica e dermatofitose, são originadas a partir das interações entre fatores extrínsecos e intrínsecos. O desequilíbrio do sistema da microbiota cutânea, pode levar a problemas fisiopatológicos, bem como induzir inflamações, infecções, doenças alérgicas e doenças autoimunes (Jo; Kennedy; Kong, 2017; Lee; Kim, 2022). Áreas como a face, couro cabeludo, tórax e costas, são comumente colonizadas por espécies de *Malassezia* e *Propionibacterium*, que metabolizam os lipídios do sebo, presentes na epiderme, em ácidos graxos livres (Grice; Dawson, 2017).

2.2 PITIRÍASE VERSICOLOR: CAUSAS E EPIDEMIOLOGIA

A PV é uma infecção leve, superficial e crônica bastante recorrente em infecções fúngicas, ocasionada pelo crescimento excessivo de leveduras pertencentes ao gênero *Malassezia*, um componente normal da microbiota cutânea. Casos mais recorrentes de PV são por espécies *Malassezia furfur* (antiga *Pityrosporum ovale*), *Malassezia globosa* e *Malassezia sympodialis*. Outras espécies

também descritas como causadoras da PV são: *Malassezia pachydermatis*, *Malassezia obtusa*, *Malassezia stricta*, *Malassezia slooffiae*, *Malassezia dermatis*, *Malassezia yamatoensis*, *Malassezia nana* e *Malassezia japonica* (Macedo; Freitas, 2021; Saunte; Gaitanis; Hay, 2020; Krueger *et al.*, 2021).

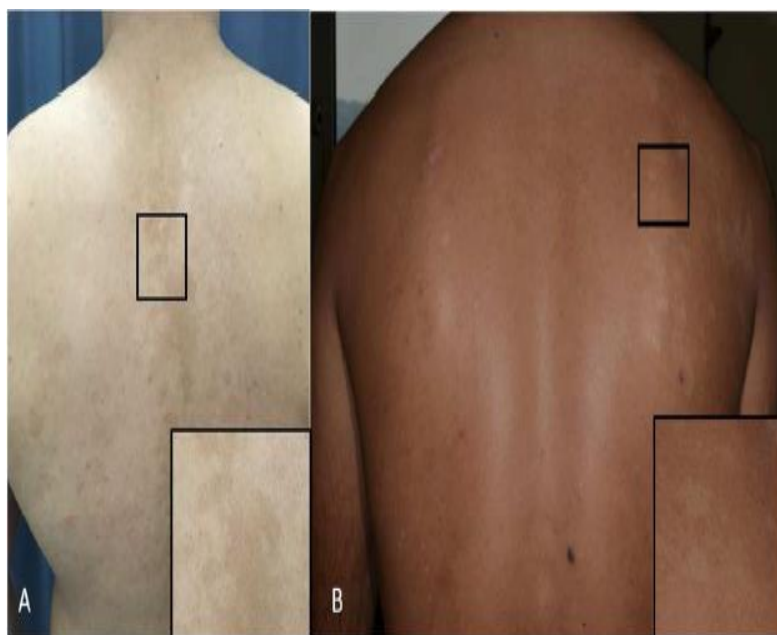
A PV tem distribuição universal, de grande incidência em regiões tropicais, tendo em vista ambientes mais quentes. Pode afetar até 40% da população, não existindo um padrão de gênero ou raça, mas adolescentes e adultos jovens geralmente são mais afetados devido às variações hormonais. A patogênese da PV é designada por predisposição genética, além de um desequilíbrio na interação fungo-hospedeiro. Por se tratar de leveduras geralmente lipofílicas, as espécies de *Malassezia* se proliferam preferencialmente em organismos com sudorese intensa, que usam cosméticos oleosos e oclusivos, ou até mesmo roupas oclusivas, causando um desequilíbrio na microbiota cutânea. Outros fatores de risco para PV são diabetes, doença de Cushing, o uso de corticoides prolongado, uso de anticoncepcionais orais e gravidez (Macedo; Freitas, 2021; Saunte; Gaitanis; Hay, 2020).

A PV afeta o estrato córneo, caracterizada por máculas ovais discretas ou confluentes, escamosas, escuras (hiperpigmentadas) ou despigmentadas (hipopigmentadas), como representado na Figura 2. As lesões aparecem principalmente em regiões seboreicas do corpo, bem como na parte superior do tronco, podendo se estender ao pescoço, ombros, abdômen, costas e extremidades proximais. As escamas de PV são finas e sobrepostas, fundindo-se em manchas maiores (Macedo; Freitas, 2021; Saunte; Gaitanis; Hay, 2020; Krueger *et al.*, 2021; Karray; Mckinney, 2022).

O diagnóstico de PV é clínico, geralmente observando visualmente as manchas que apresentam característica escamosa (Figura 3), ou seja, avalia-se a descamação da pele ao esticá-la, posicionando os dedos em um ângulo de 180°, também chamada de “evoked-skin” ou sinal de Zireli, para que a levedura *Malassezia* fique exposta (Macedo; Freitas, 2021; Varsha *et al.*, 2023). A luz negra ultravioleta e o exame microscópico de escamas embebidas em hidróxido de potássio (KOH), como representado na Figura 4, podem ser utilizados em caso de diagnóstico duvidoso. Em casos de falta de sensibilidade e especificidade no diagnóstico da PV, é necessário o uso de ferramentas auxiliares de diagnóstico como a dermatoscopia, um método que avalia lesões pigmentadas da pele por meio do dermatoscópio. A PV responde bem ao tratamento com antifúngicos, no entanto, muitas vezes é necessário um tratamento

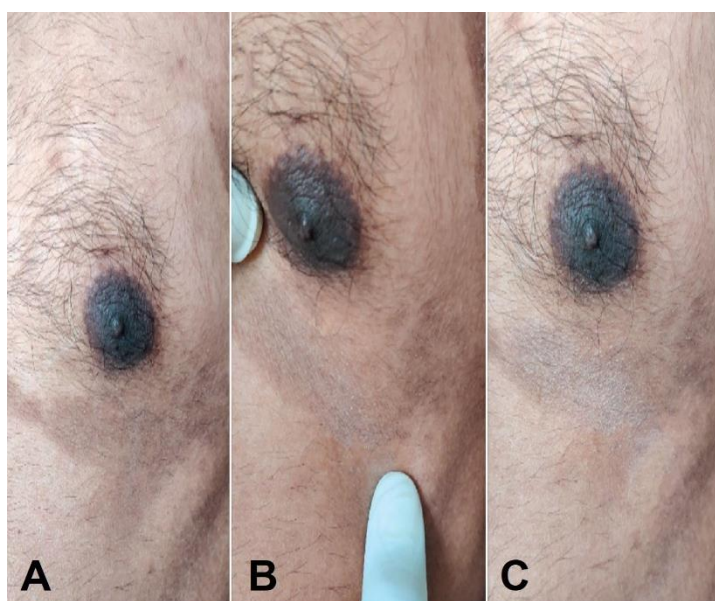
a longo prazo devido à elevada taxa de recorrência (Krueger *et al.*, 2021; A.C. Carmargo Cancer Center, 2022; Karray; Mckinney, 2022).

Figura 2 - Pitiríase versicolor. A) Máculas hiperpigmentadas no dorso, e B) Máculas hipopigmentadas.



Fonte: Adaptado de Saunte, Gaitanis e Hay (2020).

Figura 3 - Exame pelo sinal de Zireli em paciente com PV. A) PV antes do exame, B) PV durante o exame de "evoked-skin" e C) PV após o exame.

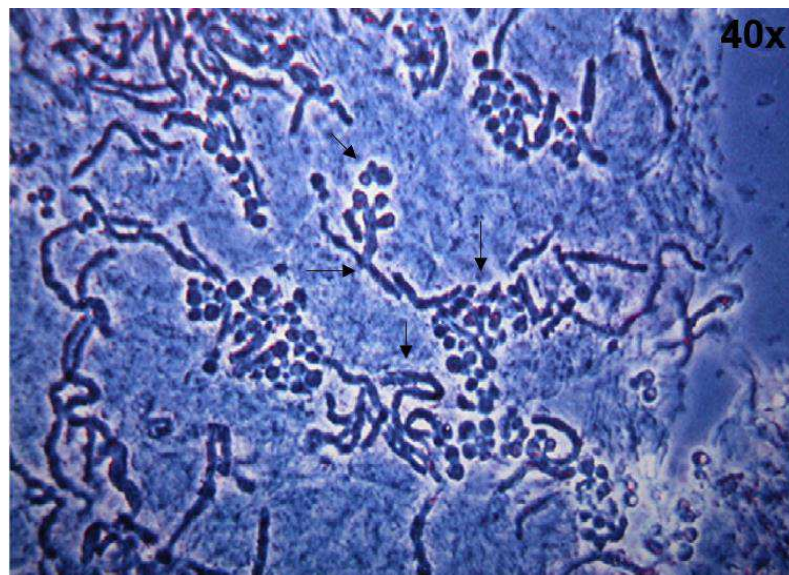


Fonte: Varsha *et al.*, 2023.

A PV ocorre quando o fungo invade células queratinizadas das camadas superficiais da pele, e alguns metabólitos fúngicos são associados à apresentação clínica da micose. As placas hipopigmentadas ou hiperpigmentadas aparecem porque o fungo causa alteração na produção de melanina nas regiões da pele em que estão colonizando (Macedo; Freitas, 2021). A hiperpigmentação desta patologia está relacionada com a produção de ácidos dicarboxílicos pelo fungo, especialmente o ácido azelaico. Já a patogênese da hipopigmentação não é completamente entendida (Comunidade Sanar, 2021).

Fragmentos de hifas curvas e septadas, e de paredes espessas, geralmente sem ramificações, são observados nas escamas da pele (Figura 4). As características leveduriformes são observadas: Blastoconídios esféricos, de paredes espessas, isolados ou em grupos, próximos às hifas, alguns brotamentos felídeos também observados, típico do gênero *Malassezia* (Andrade, 2016; Macedo; Freitas, 2021).

Figura 4 - *Malassezia* spp. vistas por microscopia óptica (indicadas pelas setas pretas), em uma porção de raspado de pele de paciente contendo PV inserida em solução de KOH.

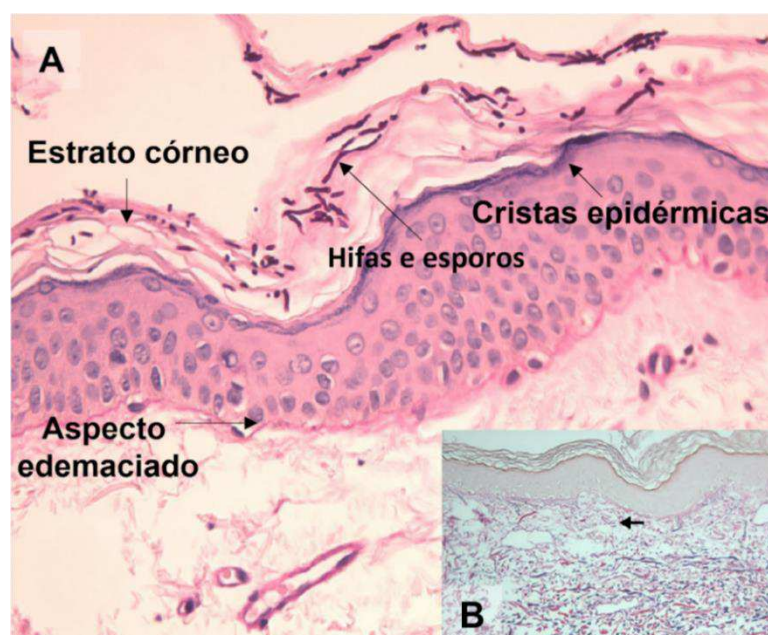


Fonte: Adaptado de Macedo; Freitas, 2020.

Em um estudo de caso realizado por Allegue e colaboradores (2018), foi realizada a biópsia de pele de um paciente com suspeita de PV (Figura 5). Foi possível observar a hiperqueratose laminada na epiderme, com achatamento das

cristas epidérmicas e dilatações vasculares de aspecto edemaciado na derme papilar. A coloração de Ácido Periódico de Schiff (PAS) foi utilizada para evidenciar a presença do microrganismo na amostra, revelando abundantes hifas curtas e septadas (violeta escuro) e esporos entre as camadas de queratina, indicando a presença de espécies leveduriformes. A coloração com orceína que evidencia as fibras elásticas, também utilizada na análise e revelou diminuição das fibras elásticas na derme papilar (seta – Figura B) e das fibras fragmentadas na derme reticular superficial, além de ectasia vascular (Orceína 100x).

Figura 5 – Epiderme analisada para diagnóstico de PV. Abundantes hifas e esporos presentes no estrato córneo, juntamente com cristas epidérmicas achatadas (PAS 200x – Figura A). Observou-se diminuição das fibras elásticas finas na derme papilar (seta – Figura B) e das fibras fragmentadas na derme reticular superficial, além de ectasia vascular (Orceína 100x).



Fonte: Adaptado de Allegue *et al.*, 2018.

Normalmente, a PV responde bem à aplicação de agentes antifúngicos tópicos, com tratamento variando entre 1 a 4 semanas. O tratamento tópico usual ocorre por meio de cremes, géis, loções, shampoos e sprays contendo antifúngicos azólicos como miconazol, cetoconazol, clotrimazol ou oxiconazol (Gupta; Lyons, 2014; TelessaúdeRS-UFRGS, 2019), ou por ativos como sulfeto de selênio e piritionato de zinco (Hudson; Sturgeon; Peiris, 2018). Em casos de recorrência da

infecção, o uso de antifúngicos sistêmicos (orais) podem ser utilizados, bem como cetoconazol, itraconazol ou fluconazol (Li *et al.*, 2021).

Entretanto, é comum haver falha no tratamento da PV devido a irritação ocasional da pele, múltiplas aplicações dos agentes tópicos por semanas ou meses, tratamentos onerosos e resistência aos antifúngicos, resultando em baixa adesão do paciente e, conseqüentemente, recorrência da PV. Podem ocorrer efeitos colaterais dos antifúngicos sistêmicos, bem como risco de toxicidade hepática pelo longo uso de cetoconazol e interações com inúmeras outras drogas. Devido a essas considerações, faz-se necessário encontrar novas estratégias antifúngicas alternativas para o tratamento futuro da PV (Gupta; Lyons, 2014; Cetoconazol, 2018; Alberdi; Gómez, 2020).

2.3 MICOSES E TRATAMENTOS

O reino Fungi é um dos reinos de organismos mais diversos do planeta. Os fungos são organismos eucarióticos unicelulares ou multicelulares, com estrutura específica de parede celular e uma membrana citoplasmática de esteróis, principalmente de ergosterol. De mais de dois milhões de espécies de fungos, cerca de 600 espécies são patógenas fúngicas humanos, de modo que 3 – 4 % dessas espécies, são responsáveis por mais de 99 % das infecções fúngicas invasivas. As infecções fúngicas, principalmente as associadas aos gêneros *Candida*, *Cryptococcus* e *Aspergillus* são frequentemente fatais e taxa de mortalidade mais elevada em comparação com infecções fúngicas superficiais comuns em seres humanos, devido à dificuldade de erradicar estas doenças apesar da existência de tratamentos farmacológicos (Shafiei *et al.*, 2020; Ivanov; Ćirić; Stojković, 2022).

As micoses humanas podem ser exógenas (dermatomicoses), endógenas (como a candidíase) e exo-endógenas (como a criptococose). Podem variar de acordo com a localização de multiplicação dos fungos, de modo que, as superficiais são comuns nas regiões cutânea e mucocutânea, em unhas (onicomicose), olhos (ceratomicose) e nos ouvidos (otomicose). Já as infecções profundas ou invasivas ocorrem em tecidos e órgãos profundos como pulmões, fígado, baço, ossos, cérebro, coração e sangue (Ivanov; Ćirić; Stojković, 2022).

O tratamento de infecções fúngicas se dá pelo uso de medicamentos antimicóticos/antifúngicos, no entanto é difícil e demorada. Por se tratar de

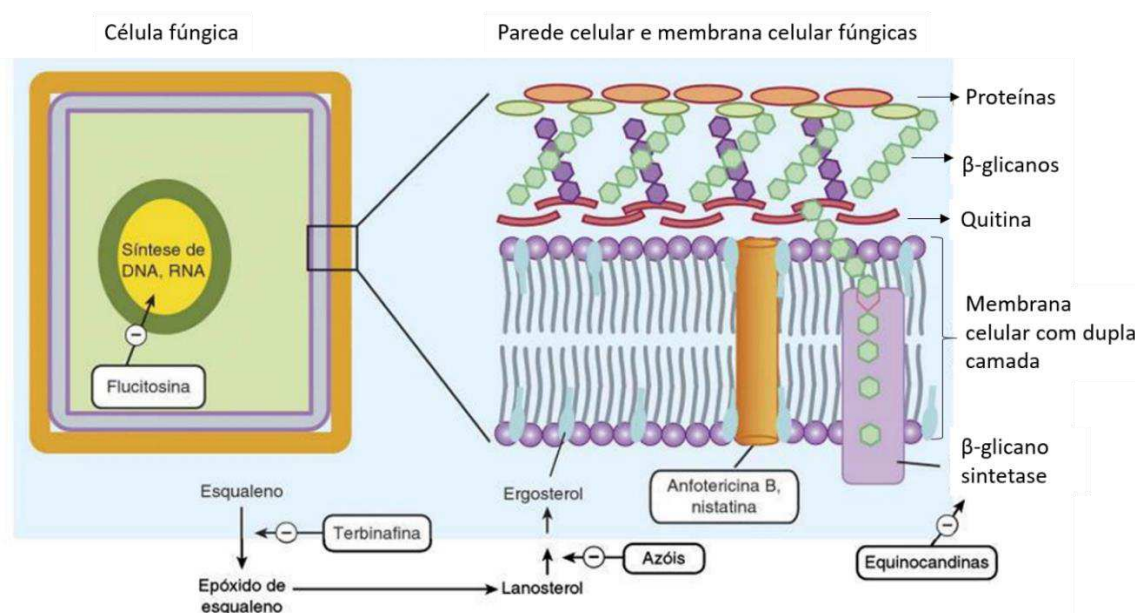
microrganismos eucarióticos, os fungos possuem processos celulares e moleculares semelhantes às células humanas. O esterol único (ergosterol) presente nas membranas celulares dos fungos, substitui o colesterol encontrado nas membranas celulares dos mamíferos. O ergosterol é específico da membrana plasmática fúngica, responsável pela fluidez, viabilidade e integridade da membrana, além de ser útil para a biogênese de diferentes enzimas ligadas à membrana. Um fármaco antifúngico tem a função de eliminar seletivamente patógenos fúngicos com toxicidade mínima para o hospedeiro, portanto, a dificuldade está em desenvolver medicamentos com alto potencial seletivo e baixos efeitos colaterais nas células humanas (Maurya *et al.*, 2021; Aryal, 2022; Ivanov; Ćirić; Stojković, 2022).

Existem várias classes de medicamentos antifúngicos no tratamento clínico e os mais comuns são (Krishnasamy *et al.*, 2018; Wall; Lopez-Ribot, 2020; Ivanov; Ćirić; Stojković, 2022; Morandi, 2023):

- Polienos: anfotericina B, natamicina e nistatina;
- Azóis: Imidazóis (cetoconazol e miconazol) e triazóis (fluconazol, itraconazol, voriconazol, etc.);
- Equinocandinas: Caspofungina, micafungina e anidulafungina;
- Alilaminas: Terbinafina e naftifina;
- Flucitosina.

Cada classe dos medicamentos antifúngicos citados acima apresenta um mecanismo de ação na célula. Estes mecanismos estão representados na Figura 6. Os azóis inibem a síntese de ergosterol no retículo endoplasmático da célula fúngica, com a interferência da enzima lanosterol 14- α -desmetilase envolvida na transformação do lanosterol em ergosterol. Os polienos provocam a morte celular atuando na membrana fúngica ligando-se ao ergosterol e causando ruptura da estrutura da membrana e extravasamento de constituintes intracelulares. A flucitosina inibe a enzima timidilato-sintetase que interfere no DNA presente no núcleo da célula fúngica. As equinocandinas inibem a (1,3) β -D-glucano sintase, que impede a síntese de glucano presente na membrana celular. Por fim, as alilaminas inibem a enzima esqualeno-epoxidase, a qual é eliminada para a síntese do ergosterol (Oliveira Santos *et al.*, 2018).

Figura 6 - Mecanismos de ação de fármacos antifúngicos comumente utilizados para tratamento das infecções fúngicas no corpo humano.



Fonte: Adaptado de Lessa, 2020.

2.4 FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS

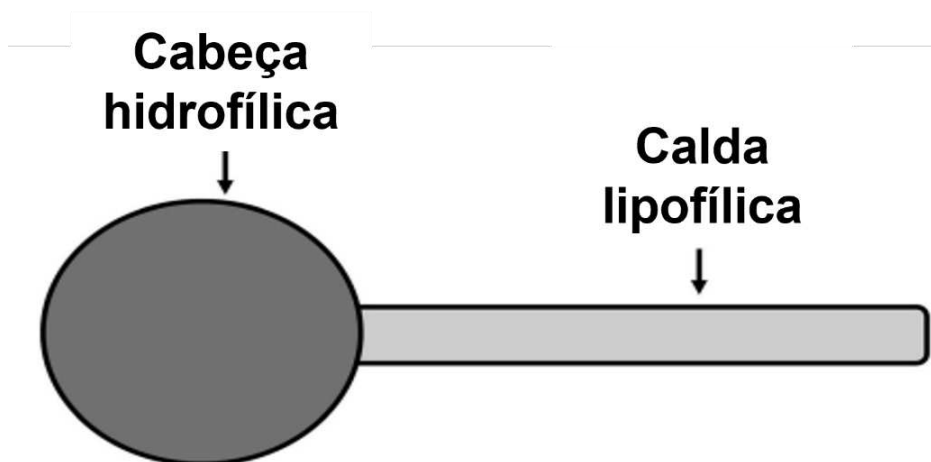
2.4.1 Sistema de Emulsões

Formulações farmacêuticas e cosméticas de uso tópico podem variar suas formas, apresentando-se como líquidas (soluções aquosas e suspensões), semissólidas (géis, emulsões e pomadas) e sólidas (pós e adesivos transdérmicos). Em formulações cosméticas, as emulsões são a forma mais comum de veículos para uso tópico (Leal *et al.*, 2022). Emulsões são misturas de dois ou mais líquidos imiscíveis em um sistema bifásico, onde partículas dispersas (gotículas) estão distribuídas como micelas ao longo de uma segunda fase, a fase contínua (líquido circundante) (Jenjob *et al.*, 2019; Sawant *et al.*, 2021; Unnikrishnan *et al.*, 2021).

As emulsões são geralmente termodinamicamente instáveis e a coalescência das gotículas ocorre para minimizar a energia livre de Gibbs do sistema. Para equilibrar esse sistema, é necessária a presença de um agente emulsificante (tensoativo), como demonstrado na Figura 7, para que ocorra a estabilização das gotículas da emulsão. Os tensoativos são escolhidos pelo equilíbrio hidrofílico-

lipofílico (EHL) adequado, com o objetivo de estabilizar a emulsão pela redução da tensão interfacial existente entre as duas fases (Jenjob *et al.*, 2019; Sawant *et al.*, 2021; Dahmer, 2023).

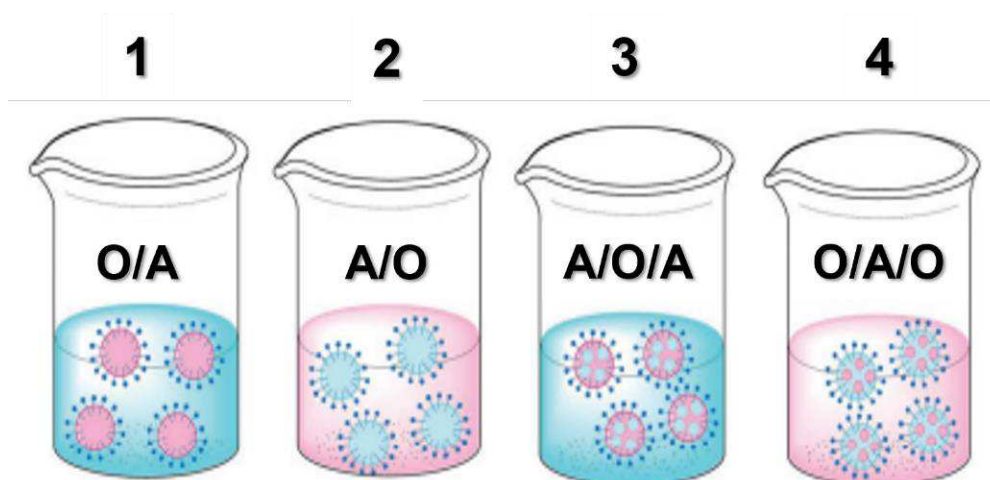
Figura 7 - Representação do sistema de um emulsificante, o qual é composto por um tensoativo, molécula com uma cabeça hidrofílica e uma cauda lipofílica.



Fonte: Adaptado de Sawant *et al.*, 2021.

Existem vários tipos de emulsões como água em óleo (A/O), óleo em água (O/A), óleo em água em óleo (O/A/O) ou água em óleo em água (A/O/A) (Figura 8) (Lonni *et al.*, 2015; Jenjob *et al.*, 2019).

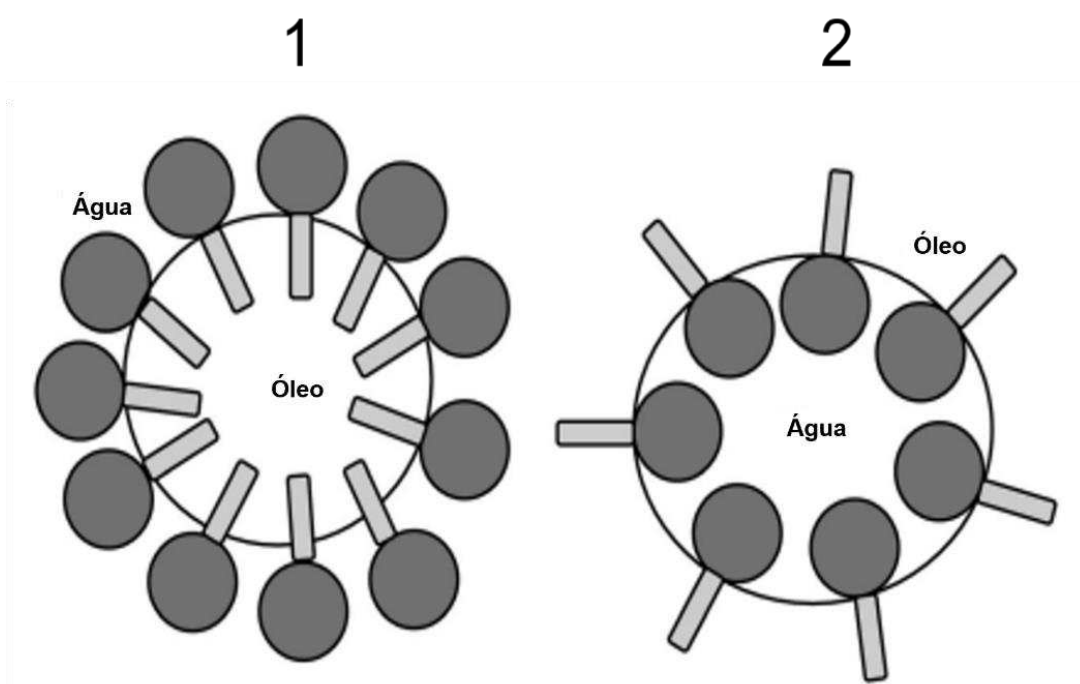
Figura 8 - Tipos de emulsões: simples 1) óleo em água (O/A), 2) água em óleo (A/O) ;e múltiplas 3) água em óleo em água (A/O/A) e 4) óleo em água em óleo (O/A/O).



Fonte: Adaptado de Jenjob *et al.*, 2019.

A emulsão bifásica O/A (Figura 9) é a forma utilizada em formulações cosméticas, de modo que, o óleo se torna homogeneamente disperso como pequenas gotículas na água. Este sistema pode ser conseguido através de homogeneização de alto cisalhamento, sendo o óleo a fase dispersa e a água, a fase externa ou contínua. Uma emulsão O/A tende a ter um caráter sensorial menos oleoso, pelo fato de a fase externa ser aquosa e ocorrer uma evaporação de água mais acelerada, e assim transmitir uma sensação de “resfriamento” imediato à pele (Unnikrishnan *et al.*, 2021; Leal *et al.*, 2022).

Figura 9 - Exemplificação das emulsões: 1) Água em óleo (A/O) e 2) Óleo em água (O/A).



Fonte: Adaptado de Sawant *et al.*, 2021.

2.5 ATIVOS ANTIMICROBIANOS

2.5.1 Óleos Essenciais

Os óleos essenciais (OEs) são definidos como misturas de componentes voláteis extraídos de plantas aromáticas. Esses componentes, são

produtos do metabolismo secundário de plantas, podendo ser obtidos a partir de raiz, caule, folhas, flores, frutos e sementes. Os metabólitos secundários são compostos em sua maioria por hidrocarbonetos da série polimetileno do grupo dos terpenos de fórmula $(C_6H_8)_n$, solúveis em álcool e éter, mas insolúveis em água, com odores característicos responsáveis pelos aromas que as plantas emitem (Arámbula *et al.*, 2019; Ebani *et al.*, 2020).

Plantas aromáticas produzem seus princípios ativos, em totalidade ou parte deles, em óleos essenciais variando a composição de acordo com o clima, a localidade e a parte de extração da planta. Mais de 3.000 variedades de compostos aromáticos voláteis foram identificadas em OEs, e alguns são amplamente empregados na indústria de cosméticos, perfumaria e aromaterapia, com diversas propriedades como antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral, antifúngica, antisséptica, antimicótica, antitumoral, antiespasmódica e imunestimulante. A forma de uso depende da espécie da planta e componentes presentes, mas de modo geral, são ingeridos ou aplicados topicamente para condições como dor, artrite, hematomas, arranhões, cicatrizes, controle de pulgas em animais, dentre outros (Arámbula *et al.*, 2019; Srivastava *et al.*, 2019; Ebani *et al.*, 2020).

Entre eles, os OEs ganharam grande popularidade em aplicações biomédicas, farmacêuticas, cosméticas, alimentícias, agrícolas e veterinárias. Além de atuarem como alternativa natural às preparações sintéticas, esses óleos têm despertado interesse na prevenção e tratamento de diversas doenças (Yadav *et al.*, 2016).

Ultimamente, os consumidores têm desenvolvido um interesse cada vez maior por produtos naturais, como alternativas aos ativos sintéticos ou agentes farmacologicamente relevantes (Yadav *et al.*, 2016). Os OEs têm sido uma alternativa terapêutica quando se trata de aplicação clínica de moléculas bioativas (Barradas; Silva, 2020).

Os OEs já são utilizados em humanos e animais há vários milênios, pela medicina popular, e têm, de fato, atividades farmacológicas comprovadas *in vitro* no tratamento de diversas doenças (Srivastava *et al.*, 2019; Barradas; Silva, 2020). De acordo com estudos de Ebani e colaboradores (2020), os OEs com propriedades antimicrobianas têm sido estudados contra cepas bacterianas e fúngicas de diversos gêneros. Para Kryeziu *et al.* (2022), o objetivo do estudo foi identificar agentes

anticancerígenos de fontes naturais, a fim de encontrar intervenções mais eficazes e menos prejudiciais quanto à resistência medicamentosa, aos efeitos colaterais e altos custos referentes às atuais terapias contra o câncer.

Em uma escala de aplicação dessas moléculas bioativas, os OEs são considerados seguros e biocompatíveis, no entanto pesquisas constantes para o desenvolvimento das formulações são necessárias. Como a composição fitoquímica e a atividade biológica dos OEs variam com a localização geográfica em que a planta se desenvolveu, estas não podem ser generalizadas e devem ser determinadas individualmente para cada OE. Dessa forma, os OEs têm usos terapêuticos limitados devido à sua alta volatilidade, baixa estabilidade, solubilidade em água e biodisponibilidade. Devido a heterogeneidade de composição com diferentes classes de moléculas (ácidos graxos, terpenos, triterpenos e muitos outros componentes lipofílicos), há necessidade de adequar as formulações, para que sejam estáveis e não tóxicas para o organismo (Barradas; Silva, 2020; Kryeziu *et al.*, 2022).

2.5.1.1 Óleo essencial de Orégano

O óleo essencial de orégano (OEO) é extraído da planta da espécie *Origanum vulgare* (Figura 10), uma erva mediterrânea nativa das regiões montanhosas do sul da Europa até o oeste asiático, que pertence à família Lamiaceae. O gênero *Origanum* está presente em diversas zonas do planeta, especialmente na região mediterrânea com aproximadamente 45 espécies, 6 subespécies e 3 variedades. É uma planta aromática, herbácea e perene, lenhosa na base e caule com aproximadamente 90 cm de altura. Os extratos utilizados para a terapia com OEO são extraídos de partes aéreas da planta, como folhas, flores e sementes (Alexander, 2020; Cordeiro, 2020; Bora *et al.*, 2022).

As principais atividades do OE de orégano são relacionadas aos monoterpenos fenólicos carvacrol e timol (Figura 11), que são biossintetizados através do processo de aromatização e hidroxilação do p-cimeno. No entanto, os compostos químicos voláteis presentes no OEO podem variar de acordo com a localização geográfica, do desenvolvimento da planta ou como resultado da modificação estrutural ou fisiológica da planta causada por fatores ambientais específicos (plasticidade fenotípica), bem como do método de extração. A composição química do OEO é

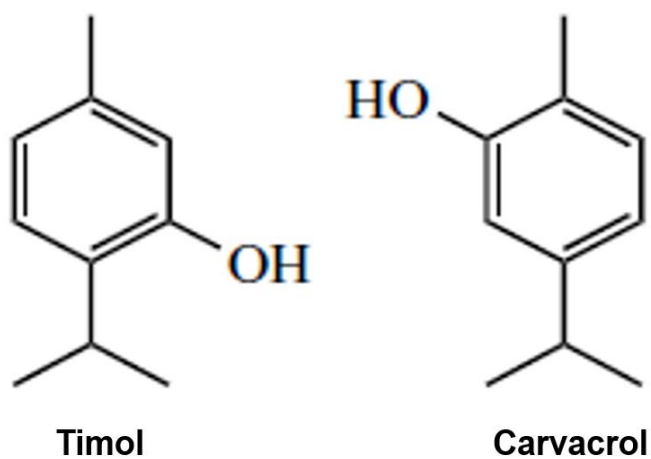
diversa incluindo monoterpenos acíclicos, monocíclicos e bicíclicos (γ -terpineno, p-cimeno, linalol, geraniol, -mirceno, trans-sabineno, -pineno e terpinen-4-ol), sesquiterpenos (1,8-cineol, -cariofileno e germacreno-D, -citronelol), flavonóides (luteolina, apigenina e quercetina), ácidos fenólicos (ácidos rosmarínico e clorogênico) e taninos (Alexander, 2020; Bora *et al.*, 2022).

Figura 10 - Representação da planta da espécie *Origanum vulgare*.



Fonte: Ferquima, 2023.

Figura 11 - Estruturas químicas dos monoterpenoides presentes no óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*).



Fonte: Adaptado de Dewick, 2002.

Em virtude dos seus componentes, o OEO vem sendo estudado para ser utilizado na indústria farmacêutica, cosmética e agroalimentar, devido seus efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, antimicrobianos e citotóxicos contra diversas linhas celulares de câncer humano, mas principalmente pela atividade antioxidante e antimicrobiana (Alexaneer, 2020; Cid-Chevecich *et al.*, 2022; Kryeziu *et al.*, 2022).

De acordo com Scandorieiro e colaboradores (2022), os principais componentes bioativos do OEO (carvacrol e timol), destacam-se entre os OEs como excelentes agentes bactericidas contra diversas cepas, incluindo os microrganismos multirresistentes. No estudo de Naqvi *et al.* (2019), *O. vulgare* apresentou atividade antifúngica contra *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus* e *Aspergillus ochraceus*, *Candida albicans*, *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium glabrum* e *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium chrysogenum*; *Fusarium proliferatum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium subglutinans*, e contra os patógenos humanos *Malassezia furfur*, *Trichophyton rubrum* e *Trichosporon beigeli*. Resultado semelhante também foi observado por Carvalho, Oliveira e Cavalcante (2021), em que *O. vulgare* teve ação antifúngica frente diversos fungos, especialmente para leveduras do gênero *Candida*. Para Santin *et al.* (2014), a levedura *Malassezia pachydermatis* foi sensível ao *O. vulgare* em baixas concentrações de ativo, tornando este OE promissor na bioprospecção de novos fármacos.

2.5.1.2 Óleo essencial de Melaleuca

O óleo essencial de melaleuca (OEM) é extraído de folhas frescas e da madeira da árvore *Melaleuca alternifolia* (Figura 12), de espécie arbórea nativa da Austrália e pertencente à família Myrtaceae. É considerado um arbusto alto de até 15 metros de altura, com uma copa espessa e de casca fina, com odor característico de terpeno, conífero e menta-cânfora. Pode ser encontrada em mais de 80% do território nacional brasileiro. Possui 140 gêneros, variando de 3.500 a 5.800 espécies, cujos frutos crescem sob condições ambientais adversas de seca, inundação e calor. O OEM é uma fonte rica em metabólitos secundários envolvidos na defesa da planta, especialmente polifenóis (Srivastava *et al.*, 2019; Assis *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2021).

Figura 12 - Representação das folhas da árvore *Melaleuca alternifolia*.



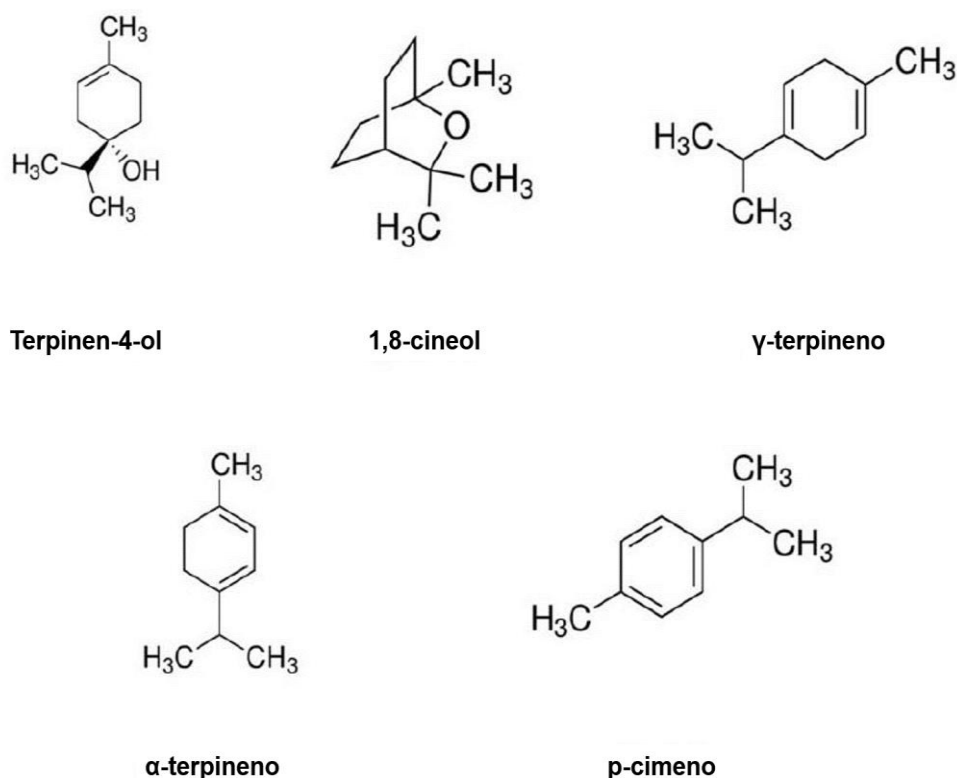
Fonte: Ferquima, 2023.

O OEM é extraído por destilação a vapor das folhas de ramos terminais da árvore *M. alternifolia*. Em sua composição estão presentes mais de 100 compostos, principalmente sesquiterpenos, monoterpenos, hidrocarbonetos e seus álcoois relacionados, bem como terpinen-4-ol, γ - e α -terpineno, p-cimeno e 1,8 cineol. Os componentes mais abundantes são o terpinen-4-ol compreendendo aproximadamente 40% da composição do óleo, e o γ -terpineno em aproximadamente 20% (Figura 13). Contudo, a concentração dos componentes está de acordo com a variedade de *M. alternifolia*, métodos e tempo de extração, clima, e idade da folha (Srivastava *et al.*, 2019; Assis *et al.*, 2020; Roana *et al.*, 2021; Santos *et al.*, 2021; Ferquima, 2023).

Estes componentes são responsáveis por diversas atividades relacionadas na literatura, bem como analgésica, antiviral, antibacteriana, antifúngica, antiprotozoária, anti-inflamatória, antioxidante, anticancerígena, inseticida e acaricida (Yadav *et al.*, 2016; Assis *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2021). As múltiplas atividades biológicas do OEM tornam-no um imenso potencial para tratamentos dermatológicos, principalmente para os faciais, especificamente para o tratamento da acne devido suas propriedades antimicrobianas de amplo espectro (Yadav *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2021). Yadav e colaboradores (2016) relatam que o OEM é um excelente ativo para controlar a resistência bacteriana, no entanto, devido sua hidrofobicidade, volatilidade e sensibilidade à luz, ao ar e à temperatura, torna-se um desafio a incorporação do

óleo na formulação de forma eficaz para manutenção da estabilidade e das propriedades ativas, com o mínimo de efeitos adversos (Yadav *et al.*, 2016; Battisti; Caon; Campos, 2021).

Figura 13 - Estrutura química dos principais componentes isolados do óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*).



Fonte: Adaptado de Roana *et al.*, 2021.

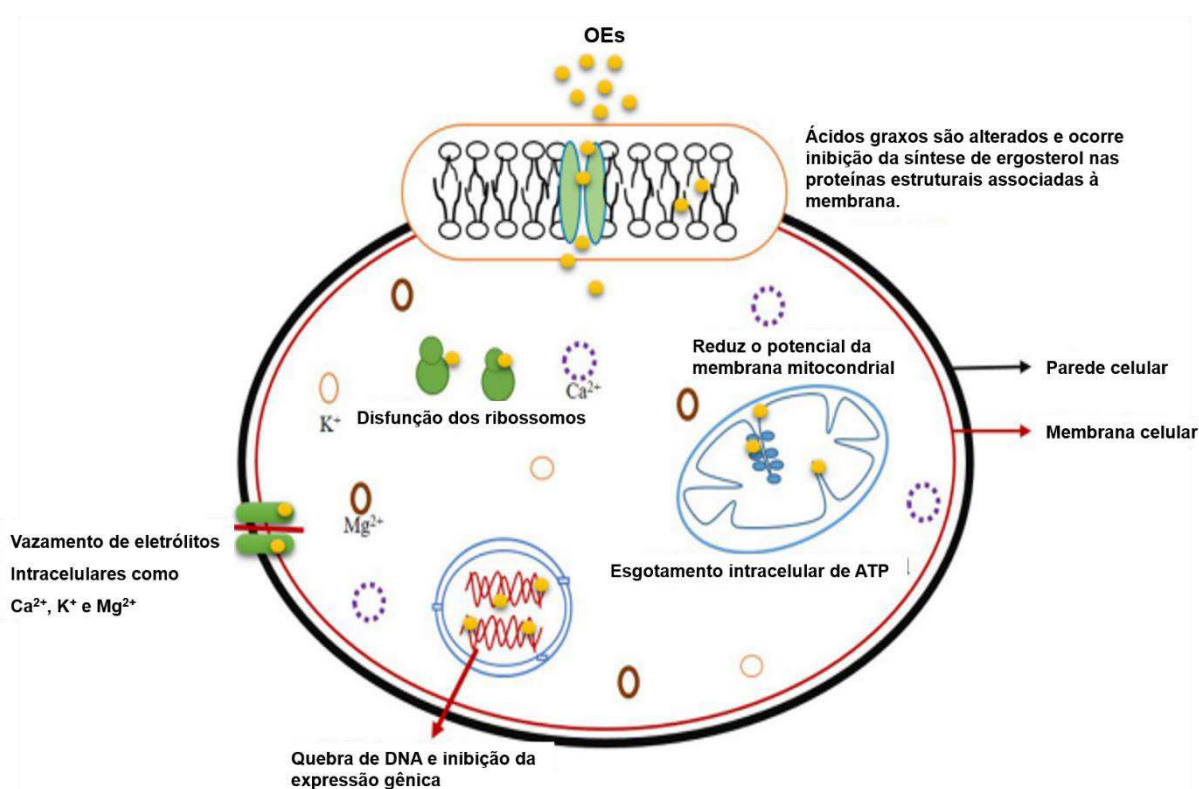
De acordo com Brun e colaboradores (2019) e Pazyar *et al.* (2013), o terpinen-4-ol abundante na composição do OEM, é o responsável pelas propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias. Além disso, outros estudos para o possível uso do OEM são observados para tratamento de saúde bucal e doenças periodontais, feridas, cicatrizes, eczema, psoríase, onicomicose, infecções fúngicas de pele e câncer (Srivastava *et al.*, 2019).

2.5.1.3 Mecanismos de ação antifúngica de óleos essenciais

As propriedades antimicrobianas dos OEs são oriundas da característica lipofílica desses compostos, tornando-os facilmente permeáveis através

da parede celular e membrana plasmática de microrganismos. A natureza hidrofóbica dos OEs provoca perda da integridade da membrana e o vazamento do material celular, causando apoptose celular (Oliveira, 2019). Na Figura 14, estão representados possíveis mecanismos de ação antimicrobiana.

Figura 14 - Representação de mecanismos de ação de óleos essenciais com propriedades antimicrobianas contra uma célula fúngica.



Legenda: Os possíveis efeitos observados pelos constituintes de OEs são: 1) Efeito na membrana plasmática devido a hidrofobicidade dos OEs, afetando a síntese de ergosterol; 2) Efeito no vazamento de íons celulares vitais como K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} , ocasionado pela desestabilização da membrana plasmática e eventual morte celular; 3) Efeito na membrana mitocondrial pela interferência na permeabilidade e fluidez da membrana plasmática, danificando assim as estruturas proteicas da membrana. Os OEs podem interagir com organelas celulares como mitocôndrias, ribossomos, retículo endoplasmático e complexo de golgi, resultando em uma redução do potencial da membrana, na desidratação da bomba de prótons e, por fim, na inibição da enzima geradora de ATP (H^+ -ATPase) (útil para o desenvolvimento de gradientes eletroquímicos e mantém o pH celular); 4) Efeito no DNA e inibição da expressão gênica, alterando as ações dos ácidos nucleicos (DNA e RNA) em atividades vitais, como crescimento, desenvolvimento, processos metabólicos subsequentes e o metabolismo de proteínas celulares.

Fonte: Adaptado de Maurya *et al.*, 2021.

A atividade antifúngica dos OEs está relacionada pela presença e interação dos metabólitos secundários, mostrando efeitos sinérgicos, aditivos e/ou complementares. Diversos estudos sobre a atividade antifúngica dos OEs relataram a

relação entre a estrutura química dos compostos e a eficácia antifúngica. A ordem básica para a eficácia antifúngica dos grupos de componentes de OEs é: Fenol > álcool > aldeído > cetona > éster > hidrocarboneto (Maurya *et al.*, 2021). Bouyahya e colaboradores (2019) demonstraram que a presença de fenóis em OEs apresentou maior especificidade para a inibição de crescimento microbiano devido a presença do grupo hidroxila nas estruturas químicas de compostos fenólicos, promovendo a ruptura da membrana plasmática e desordem na sua permeabilidade, bem como, na atividade de enzimas do ciclo de Krebs. Já os terpenóides, também presentes em OEs, afetam os ácidos graxos da membrana, alterando a dinamicidade, permeabilidade e vazamento do material celular (Bouyahya *et al.*, 2019).

Os efeitos observados pela ação dos constituintes químicos de OEs podem ser diferentes quando aplicados a outro microrganismo, de modo que, fatores como espessura da membrana, composição celular e atividades metabólicas celulares, interferem diretamente no mecanismo de ação antimicrobiano (Maurya *et al.*, 2021).

2.5.2 Nanopartículas de Prata

A nanotecnologia é uma área em expansão que está intrinsecamente associada à vida contemporânea. Existem mais de 1800 produtos contendo nanomateriais distribuídos em diversas áreas do cotidiano, bem como nos setores agrícola, alimentício, têxtil, ambiental, farmacêutico e eletrônico (Silva, 2019; Ziotti, 2023). Dentre os nanomateriais, as nanopartículas metálicas (NPs) vêm ganhando destaque por ser uma ferramenta biotecnológica eficiente, principalmente pela forte ação antimicrobiana que apresentam e são uma excelente alternativa para solucionar a resistência antimicrobiana (Bhattacharya; Saha; Mukhopadhyay, 2020; Nakazato *et al.*, 2020; Verma; Singh; Sahoo, 2020; Ziotti, 2023).

Nanomateriais apresentam tamanhos de partículas na escala nanométrica (nm) correspondente a bilionésima parte de um metro (10^{-9} metros), e possuem tamanhos de partículas que variam de 1 a 100 nm. Neste domínio de tamanho, o nanomaterial apresenta propriedades únicas, como alta relação entre área superficial e volume, alta condutividade de calor e eletricidade, supermagnetismo e alta atividade catalítica (Sun, 2016; Scandorieiro, 2020; Verma; Singh; Sahoo, 2020).

A nanotecnologia é a área mais promissora e inovadora na área médica, principalmente pela administração segura e direcionada que as NPs podem oferecer para combater diversas infecções de pele. O tamanho pequeno das partículas, formato e alta proporção entre área de superfície e volume, melhora a penetração na pele e possibilita a utilização das NPs em produtos cosméticos e dermocosméticos. Além disso, as NPs são um insumo inovador e sustentável, uma vez que podem ser produzidas por métodos ecológicos e de baixo custo (Bhattacharya; Saha; Mukhopadhyay, 2020; Nakazato *et al.*, 2020; Verma; Singh; Sahoo, 2020; Scandorieiro *et al.*, 2022).

As nanopartículas de prata (AgNPs), desde os tempos antigos, apresentam efeitos inibitórios fungicida e bactericida (Nakazato *et al.*, 2020). As AgNPs exibem uma atividade antimicrobiana de amplo espectro contra bactérias e fungos, sendo uma boa alternativa para combater espécies resistentes formadoras de biofilmes, como *Candida* spp., *Malassezia* spp., *Cryptococcus* spp., dentre outras (Figueredo; Cafarchia; Otranto, 2013; Nakazato *et al.*, 2020; Fonseca *et al.*, 2022). As AgNPs podem ser uma alternativa aos antibióticos, pois possuem capacidade de superar a resistência que as bactérias apresentam aos antibióticos, principalmente para cicatrização de queimaduras e feridas (Cadinou *et al.*, 2022).

As AgNPs são obtidas pela redução dos sais de prata (Ag^+) em prata metálica (Ag^0), que pode ocorrer por métodos sintéticos químicos, físicos, eletroquímicos ou biológicos. Biomoléculas presentes em fungos, algas e plantas são capazes de reduzir Ag^+ em Ag^0 , a fim de obter AgNPs biogênicas (Ziotti, 2023).

Nos estudos de Anwar e Colaboradores (2016), os autores demonstraram eficácia no tratamento de dermatite seborreica ocasionada pelo fungo *M. furfur* com AgNPs. Foi possível observar maiores zonas de inibição contra o fungo utilizando as AgNPs em comparação com medicamentos como itraconazol e cetoconazol. Há relatos que AgNPs biossintetizadas demonstraram atividade antifúngica contra leveduras patogênicas oportunistas e dermatófitos, bem como espécies de *Candida*, *Cryptococcus*, *Microsporum* e *Trichophyton* (Bhattacharya; Saha; Mukhopadhyay, 2020).

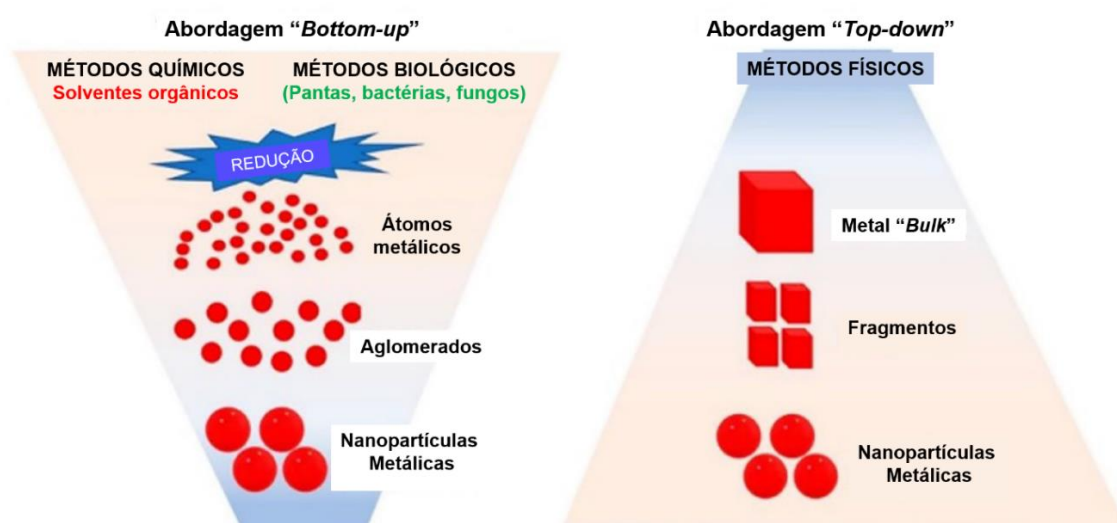
Parâmetros como tamanho, morfologia, superfície e cristalinidade, estão diretamente relacionados às propriedades das NPs. Além desses parâmetros, o potencial de redução dos metais também influencia fortemente no potencial antimicrobiano das NPs, de modo que as moléculas doadoras de elétrons se ligam

aos íons liberados pelas NPs, interferindo na função celular do microrganismo. O potencial de redução da prata é de + 0,80 V, um alto potencial quando comparado a outros metais como cobre (+ 0,34 V), Ferro (- 0,44 V) e zinco (- 0,76 V). Dessa forma, a prata se destaca pela atividade antimicrobiana de amplo espectro contra agentes patógenos (bactérias, fungos, protozoários e vírus), tendo em vista a ampla utilização de AgNPs em produtos já comercializados e se tornaram estratégias para auxiliar no combate à resistência microbiana (Scandorieiro, 2020).

2.5.2.1 Biossíntese das nanopartículas de prata

As AgNPs são aglomerados de átomos de prata que variam de 1 a 100 nm, predominantemente de forma esférica o que corresponde à situações de menor energia. As NPs podem ser sintetizadas de forma física, química ou biológica. A produção de NPs à base de metal como tecnologia pode ser feita em duas abordagens principais descritas na Figura 15: “*Bottom-up*” (de baixo para cima) e “*Top-down*” (de cima para baixo) (Netto, 2008; Scandorieiro, 2020; Amiri et al., 2022; Chue-Gonçalves, 2022).

Figura 15 – Métodos gerais de obtenção de nanopartículas metálicas, pelas abordagens “*Bottom-up*” e “*Top-down*”.



Pela abordagem “*Bottom-up*”, as nanopartículas são obtidas de modo que os átomos metálicos são aglomerados até chegarem em tamanho nanométrico. Já a abordagem “*Top-down*”, as nanopartículas são sintetizadas a partir da fragmentação de placas de metal (*bulk*) em materiais na escala nanométrica.

Fonte: Adaptado de Amiri et al., 2022.

A abordagem “*Bottom-up*”, consiste em obter as nanopartículas pela junção de unidades menores (blocos de construção de átomos, moléculas) em estruturas maiores (agregados nanométricos). Já na abordagem “*Top-down*”, as nanopartículas são formadas pela fragmentação do tamanho do material macroscópico na forma “*bulk*” até a escala nanométrica (Netto, 2008; Scandorieiro, 2020; Amiri et al., 2022; Chue-Gonçalves, 2022).

Na síntese física (“*Top-down*”), o material a granel “*bulk*” é convertido em nanomaterial por processos físicos como evaporação-condensação, ablação a laser, método de deposição de átomo de metal solvatado, moagem mecânica (*Ball milling*) e irradiação gamma. Entretanto, os métodos físicos não são vantajosos devido ao alto consumo energético do processo, tempo longo para as nanopartículas atingirem estabilidade termal, além de criarem nanopartículas com distribuição de tamanhos bastante dispersos (Jamkhande *et al.*, 2019; Scandorieiro, 2020; Islam, Jacob, Antunes, 2021; Naganthran *et al.*, 2022).

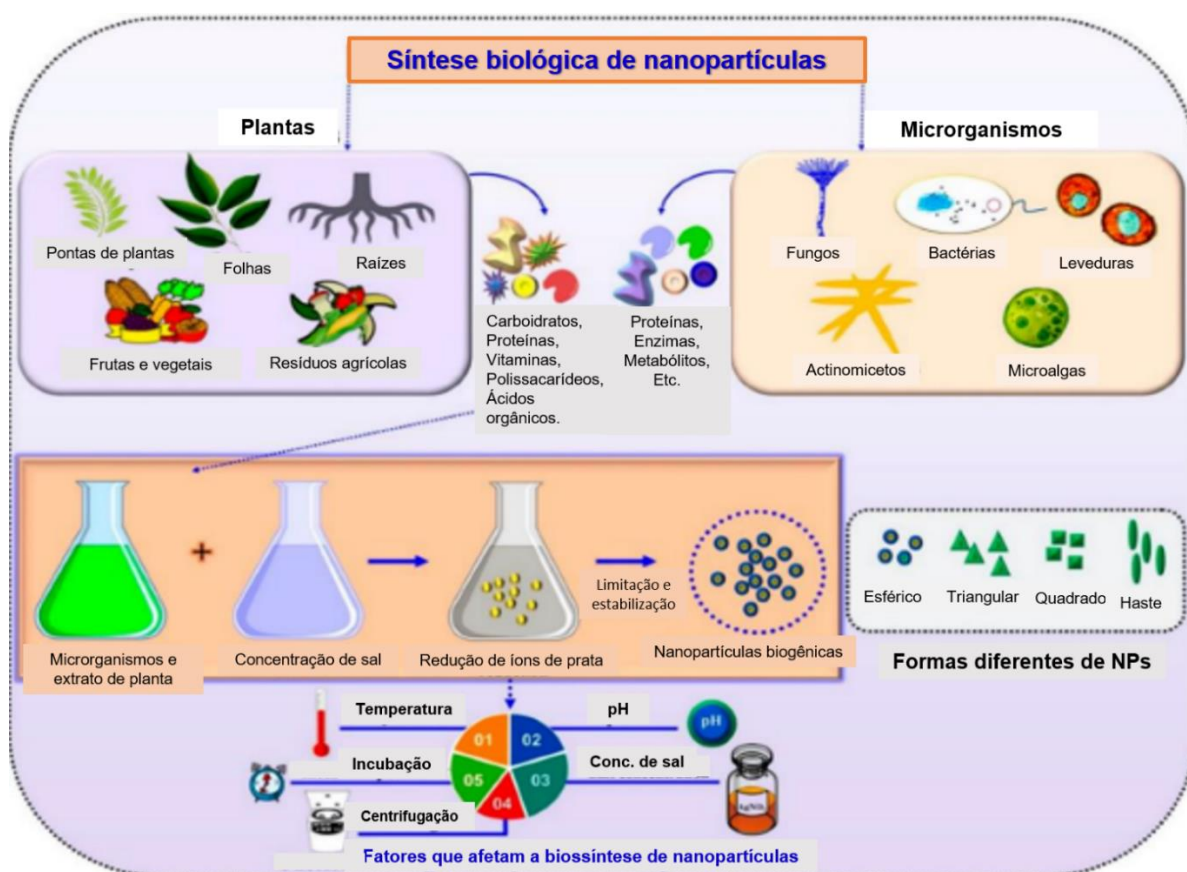
A abordagem “*Bottom-up*”, podem ocorrer por métodos químicos e biológicos. A síntese química de NPs utiliza três componentes principais: o precursor do metal, agentes redutores e agentes estabilizantes. Para a síntese de AgNPs, a redução ocorre partindo de precursores como nitrato de prata (AgNO_3), perclorato de prata (AgClO_4) ou tetrafluoroborato de prata (AgBF_4). Como agentes estabilizantes podem ser utilizados compostos como polivinilpirrolidona (PVP), polissacarídeo, álcool polivinílico (PVA), polietilenoglicol (PEG), quitosana, olelamina e ácido glucônico. A uniformidade das AgNPs é controlada pelas condições de reação como pH, tempo de reação e agentes de capeamento (Chue-Gonçalves, 2022).

O processo de síntese biológica, também chamado de “síntese verde”, produz nanopartículas biogênicas e tem sido muito relatado nos últimos anos, principalmente para a eficácia biotecnológica que as NPs oferecem. A Figura 16 demonstra os possíveis métodos de obtenção de nanopartículas metálicas biogênicas, podendo ocorrer partindo de plantas ou microrganismos (Nakazato *et al.*, 2020; Cruz-Luna *et al.*, 2021).

Compostos bioativos presentes em fungos, bactérias, plantas e algas, apresentam potencial para atuarem como agentes redutores em sínteses biológicas de nanopartículas metálicas (Prabhu; Poulouse, 2012). Esses compostos podem ser flavonoides, compostos fenólicos, terpenóides, enzimas, coenzimas, proteínas e

açúcares, e promovem a redução dos cátions metálicos ao estado de oxidação zero. Comparando a síntese química com a biossíntese, a reação de redução tende a ser mais lenta na biossíntese, no entanto, são biomoléculas que atuam como agentes estabilizadores revestindo as partículas, impedindo a agregação e conservando suas atividades biológicas (Razak *et al.*, 2021).

Figura 16 – Representação dos processos de síntese verde ou biológica de nanopartículas metálicas: Possíveis matérias-primas que favorecem a redução do metal, processo de produção das NPs, fatores que afetam a biossíntese e diferentes formas e tamanhos de NPs produzidas.



Fonte: Adaptado de Cruz-Luna et al., 2021.

A formação das nanopartículas metálicas biogênicas, como as de prata (bioAgNP), ocorre de modo geral pelo contato do extrato biológico contendo as biomoléculas com soluções de sais metálicos, para que ocorra a redução do metal. Alguns parâmetros são levados em consideração, bem como a concentração do extrato e do sal, temperatura, pH, tempo de incubação, e radiação, influenciando

diretamente na eficácia do processo que envolve o crescimento fúngico e a etapa de oxi-redução (Roy *et al.*, 2019).

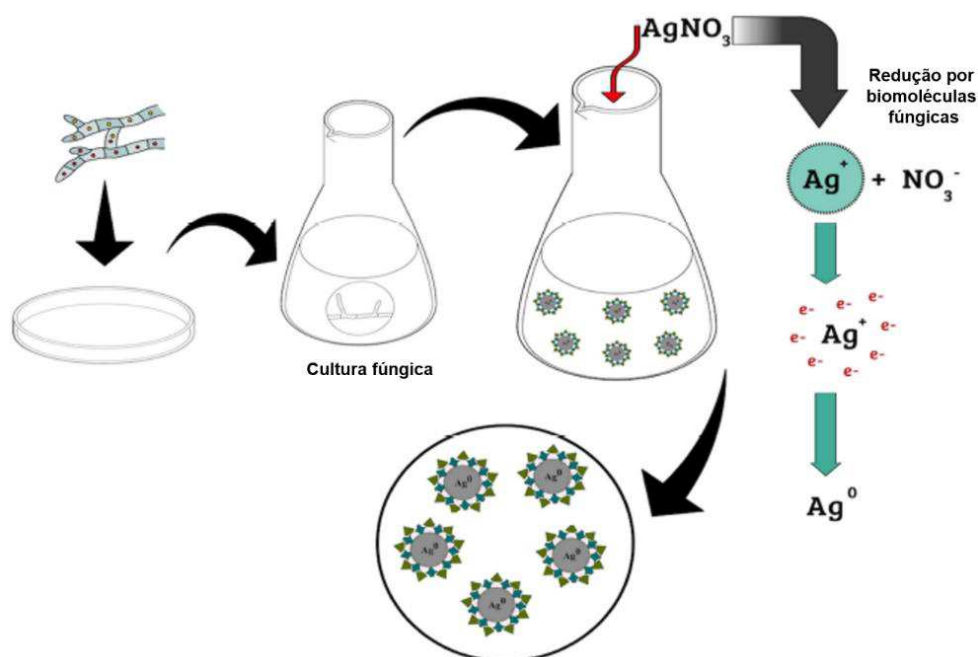
A caracterização das bioAgNPs (tamanho, forma e potencial zeta) é uma etapa importante após a síntese. Com a síntese biogênica, é possível sintetizar bioAgNP com excelentes propriedades antimicrobianas, além de ser relativamente simples após padronização, limpa, sustentável e econômica, e proporciona maior biocompatibilidade no uso de nanopartículas (Guilger-Casagrande; Lima, 2019; Nakazato *et al.*, 2020; Cruz-Luna *et al.*, 2021). Cada metodologia de obtenção possui vantagens e desvantagens em termos de complexidade do processo, variação no tamanho das partículas, estabilidade, toxicidade, aplicações e custo (Chue-Gonçalves, 2022).

Quando comparados com as bactérias, os fungos apresentam maior eficácia na biossíntese de nanopartículas metálicas, visto que, a alta tolerância aos metais e secreção de proteínas resulta em maiores quantidades de nanopartículas produzidas (Prabhu; Poulouse, 2012; Guilger-Casagrande; Lima, 2019). Além disso, um bom resultado para a síntese fúngica está na alta produção de biomassa fúngica e facilidade para obtenção do filtrado a partir desta biomassa. Por fim, comparando a síntese fúngica com a síntese por plantas, o micélio dos fungos é mais resistente à agitação e pressão do processo de desenvolvimento das nanopartículas metálicas biogênicas (Guilger-Casagrande; Lima, 2019).

Mesmo que haja muitos estudos publicados sobre a síntese de bioAgNP utilizando fungos, os mecanismos específicos envolvidos ainda não foram totalmente elucidados (Guilger-Casagrande; Lima, 2019). Um mecanismo de síntese de bioAgNP utilizando moléculas reativas de fungos está representado na Figura 17. É conhecido que a síntese extracelular ocorre de acordo com reações nas quais as enzimas presentes no filtrado livre de células fúngicas atuam reduzindo os íons de prata (Ag^+) em prata elementar (Ag^0) em agregados nanométricos (nm). A mudança de coloração do filtrado fúngico após a reação é um indicativo que ocorreu a formação das bioAgNP. Usar a espectroscopia no UV-visível como auxiliar para observar bandas de ressonância plasmônica de superfície refletindo a alteração das propriedades ópticas do material é um método de confirmação das bioAgNP. Picos em comprimentos de onda de absorvância em bandas que variam na faixa de 400 a 450 nm indicam a presença de bioAgNP na solução. Os parâmetros de condições de síntese, espécie do fungo, temperatura, pH e meio de dispersão interferem no

tamanho das bioAgNP, bem como na presença de coberturas nas nanopartículas (Guilger-Casagrande; Lima, 2019).

Figura 17 - Mecanismos de síntese biológica de nanopartículas de prata utilizando um fungo filamentoso como precursor de biomassa fúngica.



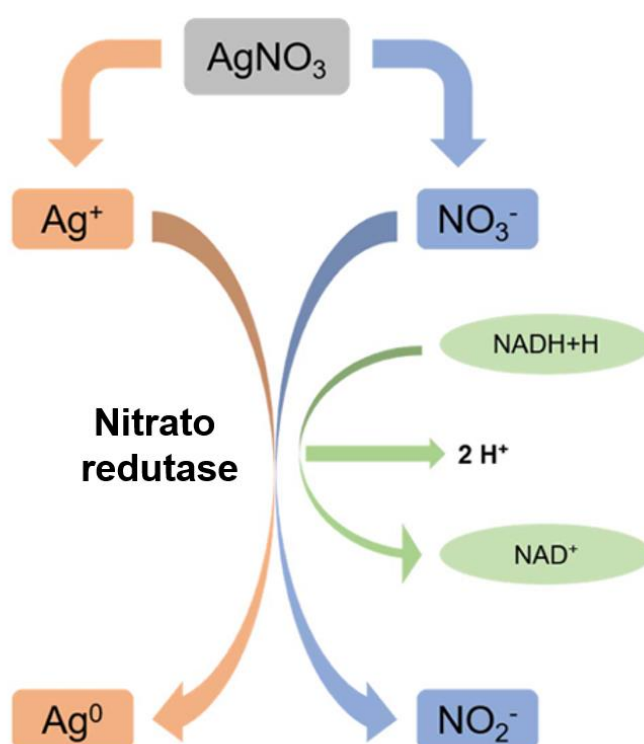
Fonte: Adaptado de Guilger-Casagrande; Lima, 2019.

Devido a presença de enzimas/proteínas, aminoácidos, polissacarídeos, vitaminas, dentre outras biomoléculas presentes no filtrado fúngico, propõe-se que a redução de íons Ag^+ venha das combinações de biomoléculas encontradas nesses extratos. Nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) e enzimas nitrato redutase dependentes de NADH apresentam grande importância na síntese de bioAgNP. Essas biomoléculas são associadas às vias complexas que envolvem a transferência de elétrons durante a conversão de NADPH/NADH para NADP⁺/NAD⁺ (Figura 17) (Roy *et al.*, 2019; Guilger-Casagrande; Lima, 2019).

O mecanismo mais aceito (Figura 18) é baseado na presença da enzima “nitrato redutase”, a qual converte nitrato (NO_3^-) em nitrito (NO_2^-). Durante a redução de NO_3^- em NO_2^- , ocorre a transferência do elétron para o íon prata (Ag^+), que então é reduzido a prata metálica (Ag^0). Além disso, a presença de grupos funcionais na parede celular fúngica também causam a redução de Ag^+ a Ag^0 sem a presença da enzima nitrato redutase. Tanto fungos quanto bactérias apresentam

vantagens em relação à produtividade de bioAgNP devido à alta quantidade de enzimas, proteínas e componentes redutores em suas superfícies celulares. Os fungos apresentam uma vantagem em relação a síntese de bioAgNP, pois podem prender a Ag^+ em suas células superficiais, causando assim a redução subsequente com as enzimas (como naftoquinonas e antraquinonas) de sistemas fúngicos (Roy *et al.*, 2019).

Figura 18 - Mecanismo de redução da prata baseado na presença da enzima nitrato redutase.



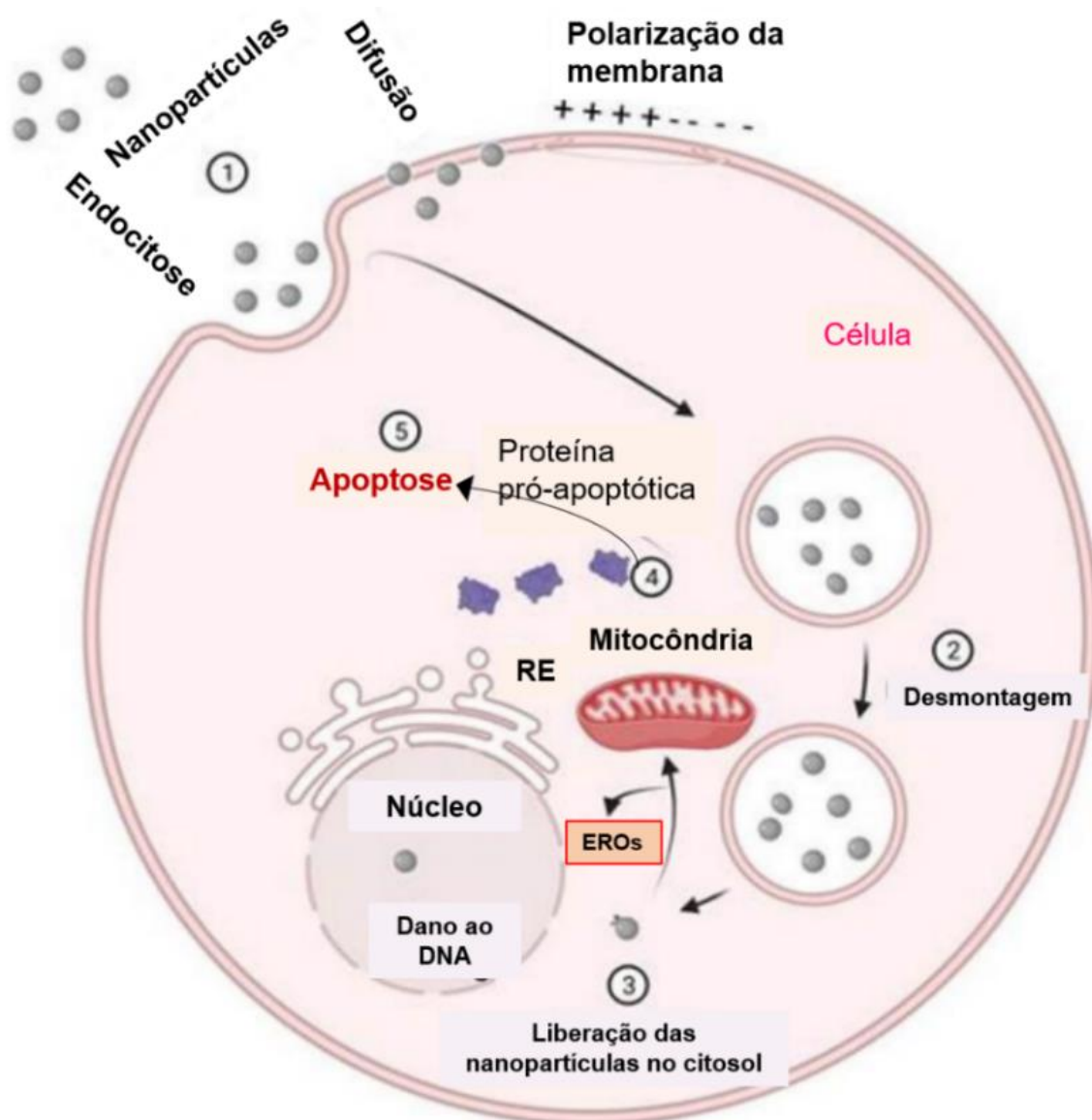
Fonte: Roy *et al.*, 2019.

2.5.2.2 Mecanismos de ação antifúngica de nanopartículas metálicas biogênicas

As AgNPs possuem muitos mecanismos de ação relacionados à sua ação antimicrobiana, e o mais provável de ocorrer está representado na Figura 19. Um desses mecanismos é a ligação que a AgNPs faz com a superfície do microrganismo alterando a integridade da membrana. AgNPs também agem penetrando no interior do microrganismo e interagem com seus componentes intracelulares, danificando o material celular. As AgNPs podem induzir reações de

espécies reativas de oxigênio (EROs). Além disso, podem modificar a transdução de sinal necessário para o ciclo de vida da célula (Masimen *et al.*, 2022).

Figura 19 - Mecanismo de ação de nanopartículas metálicas biogênicas contra células fúngicas.



Legenda: (1) As nanopartículas biogênicas inibem o crescimento fúngico entrando nas células pelos processos de endocitose e difusão. (2) Com a entrada das nanopartículas, ocorre a desmontagem da membrana e das vesículas (formadas por endocitose) contendo as nanopartículas. (3) As nanopartículas são liberadas no citoplasma celular. (4) Então, ocorre indução ao estresse oxidativo formando EROs. (5) A morte celular é induzida pela ativação de proteínas pró-apoptóticas e produção de EROs, o que leva à disfunção mitocondrial, à inibição enzimática e à redução da replicação de DNA (danos ao DNA e danos às proteínas), via apoptose mediada por estresse do retículo endoplasmático. **Fonte:** Adaptado de Gurunathan; Lee; Kim, 2022.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar formulações de emulsões hidratantes não-iônicas do tipo O/A, de uso tópico, acrescido de óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*) e/ou melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), associado ou não às nanopartículas de prata biogênicas como uma nova alternativa natural para o tratamento da *Pitiríase versicolor*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar as nanopartículas de prata biogênicas a partir do fungo *Lichtheimia ornata*;
- Avaliar a atividade antifúngica dos óleos essenciais e das nanopartículas de prata pelas metodologias de disco-difusão, concentração inibitória mínima, concentração fungicida mínima, e pelo teste de combinação contra *Malassezia pachydermatis*;
- Desenvolver as formulações da emulsão para a Pitiríase versicolor de acordo com o planejamento simplex-centroide;
- Realizar a caracterização farmacotécnica e o ensaio de estabilidade preliminar das formulações;
- Avaliar a eficácia antifúngica das formulações pelas metodologias de curva de sobrevivência e microscopia eletrônica de varredura contra *M. pachydermatis*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DOS BIOATIVOS

4.1.1 Óleos Essenciais

Os óleos essenciais de Orégano (OEO) e Melaleuca (OEM) foram adquiridos da empresa Ferquima Indústria e Comércio Ltda. (Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil), cuja caracterização consta nos Anexos A e B.

4.1.2 Biossíntese das Nanopartículas de Prata Biogênicas (bioAgNP)

As bioAgNP foram produzidas por meio de processo nanobiotecnológico a partir do fungo *Lichtheimia ornata* no Laboratório de Micologia e Métodos Alternativos (LAMIC e LAMEA) da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

A síntese biológica das bioAgNP foi realizada pela técnica descrita por Morandi (2023). O fungo foi cultivado em meio líquido contendo extrato de levedura (0,5%) e incubado a 28 ± 2 °C por 72 h. A biomassa fúngica foi filtrada e suspensa em água destilada esterilizada. Aproximadamente 1 g desta biomassa foi transferida para um frasco contendo 10 mL de água destilada, mantendo-se sob agitação (150 rpm), a 28 ± 2 °C por 72 h. Após o período, o sobrenadante foi separado da massa micelial formada através de centrifugação a 5.000 rpm, por 15 min a 25 ± 2 °C. Para a síntese de bioAgNP, ao sobrenadante foi adicionado nitrato de prata (AgNO_3) (Sigma Aldrich®, St Louis, MO, USA) a 10 mM, e esse sistema foi incubado por 4 dias a 28 ± 2 °C. Para lavagem, as bioAgNP foram centrifugadas a 15000 rpm e ressuspensas com água ultrapura. O processo foi realizado três vezes. Todas as soluções contendo bioAgNP foram armazenadas sob refrigeração a 4 ± 2 °C até a utilização.

4.1.2.1 Caracterização das Nanopartículas de Prata Biogênicas

A caracterização das bioAgNP foi realizada pelas técnicas de detecção por espectrofotometria UV-visível (UV-vis), espalhamento dinâmico da luz

(DLS), potencial zeta, espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), fluorescência de raios X por dispersão de energia (EDXRF).

Para a espectrofotometria de UV-vis, foram retiradas alíquotas da solução com nanopartículas metálicas, e o espectrofotômetro UV – Vis (BioTek Synergy HT) foi utilizado para mensurar a absorvância e realizar o monitoramento da produção. Para a caracterização, foram retirados 100 μL da solução com bioAgNP e feita a observação dos espectros de formação em comprimentos de onda variando de 200 – 900 nm.

As medidas de FTIR foram realizadas em solução coloidal de bioAgNP para verificar as bandas das ligações químicas resultantes na superfície das partículas. Desse modo, foram retirados 100 μL da solução com uma pipeta volumétrica Pasteur e inseridos em pastilhas de KBr. A análise foi realizada no equipamento Bruker-Vertex 70, equipado de acessório ATR com cristal Gê 45°, com resolução de 2 cm^{-1} na faixa de 400 – 4000 cm^{-1} , pertencente ao Laboratório de Química Prebiótica, na Universidade Estadual de Londrina (UEL).

O tamanho das nanopartículas foi determinado por DLS utilizando o equipamento ZetaSizer Nano-ZS, Malvern Instruments, Southborough, UK. O equipamento utiliza a espectroscopia de correlação de fótons (PCS) para mensurar a dimensão das partículas. O movimento browniano faz com que a intensidade da luz se espalhe em função do tempo, logo, partículas grandes apresentam movimentos mais lentos e partículas menores, movimentos mais rápidos, demonstrando variações na dispersão de luz e, conseqüentemente, o tamanho da partícula.

O potencial Zeta (ζ) é utilizado para caracterizar a estabilidade de uma solução. Para a realização das medidas de potencial, foi utilizado o equipamento Zetasizer Nano-ZS, Malvern Instruments, Southborough, UK. A determinação do potencial Zeta também ocorre pelo espalhamento dinâmico de luz (DLS), utilizando a direção e a velocidade do movimento das partículas, em exposição à um campo elétrico, para medir o potencial. As amostras foram diluídas para uma concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ utilizando água destilada, e em seguida as partículas foram dispostas em células capilares equipadas com eletrodos de ouro.

Por fim, a técnica de espectrometria de raios X por dispersão em energia foi feita para mensurar as concentrações de nanopartículas biogênicas na amostra. Esta técnica não destrutiva faz uso da identificação de raios X característicos emitidos por átomos previamente excitados para análises qualitativas e quantitativas

das amostras estudadas. O espectrômetro utilizado foi o EDX-720 da SHIMADZU, pertencente ao Laboratório de Análises por Técnicas de Raios X (LARX) da UEL. Para as medidas, o tubo de raios X foi submetido a uma tensão de 50 kV e corrente de 30 μ A. Para dosar a concentração de bioAgNP, amostras padronizadas de 5 ml com diferentes concentrações de AgNO₃ (1 mM, 2,5 mM, 5,0 mM, 7,5 mM, 10 mM, 15 mM e 20 mM) foram utilizadas para fins de calibração. Todas as amostras foram depositadas em células descartáveis, com dupla abertura, sobre uma película de poliéster (MYLAR®) com 2,5 μ m de espessura, ambos da Chemplex® Industries INC, Palm City, FL, USA, e medidas durante o tempo de 5 minutos cada. Após a análise, a intensidade das bioAgNP foi avaliada e correlacionada com as intensidades dos padrões, determinando as concentrações através da equação da reta.

4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ANTIMICROBIANOS

4.2.1 Cultivo do Microrganismo

A cepa da levedura *Malassezia pachydermatis* foi previamente incubada em ágar Extrato de Levedura Peptona Dextrose (YPD), por 48 h a 37 ± 2 °C. Após essas condições, foram preparados os inóculos respectivos para cada teste antimicrobiano.

4.2.2 Efeito Antifúngico dos Ativos Individuais pelo Ensaio de Disco-difusão

A técnica de disco-difusão foi realizada de acordo com o documento M44-A do National Committee for Clinical Laboratory Standards (CLSI), com modificações necessárias (CLSI, 2004).

A cepa de *M. pachydermatis* foi previamente incubada em ágar YPD, por 48 h a 37 ± 2 °C. O inóculo foi preparado suspendendo colônias de *M. pachydermatis* em uma solução salina esterilizada de NaCl (Cloreto de Sódio) a 0,85% (8,5 g/L). A turbidez foi ajustada visivelmente seguindo o padrão de 0,5 McFarland, a fim de obter uma suspensão de aproximadamente 1×10^6 a 5×10^6 UFC/mL. Após 15

minutos do ajuste da turbidez, utilizou-se um *swab* para espalhar uniformemente o inóculo sobre o meio de cultivo ágar YPD em placa de Petri.

Após a distribuição do inóculo, um disco foi colocado no centro da placa e pressionado com uma pinça contra o ágar, a fim de garantir contato completo no mesmo. Então, aplicou-se 10 µL de OEO, OEM e bioAgNP sobre os discos dispostos em placas separadas. Por fim, as placas foram incubadas por 48 h a 37 ± 2 °C. O teste foi realizado em triplicata para cada ativo estudado, e o resultado foi obtido medindo com uma régua o diâmetro de inibição de crescimento.

4.2.3 Avaliação da Concentração Inibitória Mínima dos Antimicrobianos Individualmente

A determinação da CIM foi realizada de acordo com o documento M27 do CLSI (CLSI, 2017), com modificações. Inicialmente, a cepa de *M. pachydermatis* foi previamente incubada em ágar YPD, por 48 h a 37 ± 2 °C. Colônias de *M. pachydermatis* foram suspensas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) a 1%, onde 10 µL foram retirados e colocados em câmara de Neubauer para a realização da contagem de células. Após contagem, preparou-se uma suspensão de *M. pachydermatis* a 10^3 UFC/mL em meio RPMI 1640 (com glutamina e vermelho fenol, sem bicarbonato - Gibco™, ThermoFisher Scientific), acrescido de tampão MOPS-ácido 3-(n- morfolino) propanosulfônico (INLAB São Paulo, Brasil), com pH entre 7,2 e 7,4.

A CIM foi determinada em triplicata, diluindo seriadamente os ativos OEO, OEM e bioAgNP em placas de 96 poços. Primeiramente, alíquotas de 100 µL de meio RPMI 1640 e tampão MOPS-ácido 3-(n- morfolino) propanosulfônico, foram adicionadas do 1° ao 11° poço (controle positivo), e 200 µL no 12° poço (controle negativo). Após, 100 µL dos ativos com concentrações conhecidas (OEO a 1%, OEM a 2% e bioAgNP a 25%) preparados do mesmo meio de cultura foram adicionados e diluídos seriadamente. Por fim, 100 µL da suspensão de *M. pachydermatis* a 10^3 UFC/mL foram adicionados nos poços de 1 a 11, e as placas foram incubadas por 48 h a 37 ± 2 °C. A leitura dos resultados foi realizada comparando os poços que apresentavam os compostos testados e o controle positivo, buscando uma dose eficaz.

4.2.4 Avaliação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos Antimicrobianos Individualmente

A avaliação da CFM foi realizada segundo protocolo descrito por Espinel-Ingroff e colaboradores (2002) com modificações. Após a leitura visual dos resultados de CIM, plaqueou-se 10 µL em ágar YPD, de cada poço sem crescimento visual de *M. pachydermatis* em triplicata. As placas foram incubadas por 48 h a 37 ± 2 °C. Após o tempo de incubação, foi possível comprovar a concentração que inibiu o crescimento fúngico, ou seja, que não houve crescimento de colônias, sendo a CFM.

4.2.5 Interação Antifúngica dos Antimicrobianos em Combinações Binárias

O teste de interação entre bioAgNP, OEM e OEO, foi elaborado similarmente ao teste de microdiluição em caldo, seguindo a metodologia de Bocate e colaboradores (2019) com adaptações. Foi utilizado meio RPMI 1640 (com glutamina e vermelho fenol, sem bicarbonato - Gibco™, ThermoFisher Scientific) acrescido de tampão MOPS-ácido 3-(n- morfolino) propanosulfônico (INLAB, São Paulo, BR), pH 7,2 – 7,4, com ajuste de inóculo para 1x10³ UFC/ml para *M. pachydermatis*.

Em uma placa de 96 poços, foram adicionados 100 µL de meio RPMI 1640 em cada poço. Um dos compostos foi diluído seriadamente, da primeira à última coluna na direção horizontal, e o outro composto da primeira à última linha na direção vertical, reservando os dois últimos poços da última linha para os controles positivo e negativo respectivamente. As placas foram incubadas por 48 h a 37 ± 2 °C, seguido de análise visual.

Para estimar a interação entre os compostos, o índice de concentração inibitória fracionada foi determinado (ICIF), de acordo com a equação:

$$ICIF = \frac{CIMa \text{ em combinação}}{CIMa \text{ isolada}} + \frac{CIMb \text{ em combinação}}{CIMb \text{ isolada}}$$

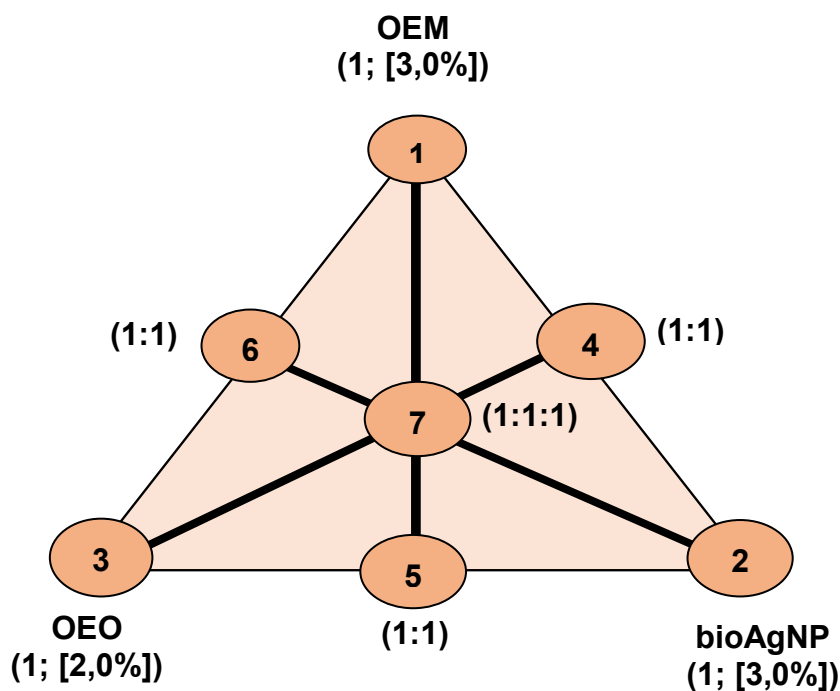
Onde ICIF ≤ 0,5 indica sinergismo entre os compostos, 0,5 < ICIF ≤ 1 indica aditismo, 1 < ICIF ≤ 4 indica indiferença e ICIF > 4 indica antagonismo (Bocate *et al.*, 2019).

4.3 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES

Foram preparadas oito formulações na forma de emulsão não-iônica do tipo O/A, sendo sete de tratamento, cujas concentrações dos ativos variaram de 0,67% (v/p) a 3,0% (v/p), sendo estabelecidas de acordo com um planejamento experimental do tipo Centroide Simplex, com modificações, conforme ilustrado na Figura 20 (Neto; Scarminio; Bruns, 2001). As concentrações dos ativos (OEO, OEM e bioAgNP) foram estudadas a partir da concentração inibitória mínima frente a levedura *M. pachydermatis* e de acordo com a revisão de literatura.

A formulação base foi composta por: água destilada, edeato dissódico (EDTA 2Na), copolímero de acriloldimetiltaurato, glicerina, olivato cetearílico e olivato de sorbitano, éster do óleo de oliva, triglicérides de ácido cáprico e caprílico, óleo de amêndoas doce, butilhidroxitolueno, alantoína, propilenoglicol, acetato de tocoferol, fenoxietanol e metilisotiazolinona, ciclometicone (Tabela 1), cujas concentrações não foram descritas por motivo de depósito de patente.

Figura 20 - Planejamento experimental do tipo Centroide-Simplex modificado com três ativos (OEO, OEM e bioAgNP) para a escolha da melhor formulação.



Fonte: Adaptado de Neto; Scarminio; Bruns, 2003.

Este planejamento é representado por um triângulo equilátero no qual os vértices correspondem aos ativos puros: 1) OEM; 2) bioAgNP e 3) OEO. As arestas, são as misturas binárias na mesma proporção (1:1), sendo elas: 4) OEM + bioAgNP; 5) OEO + bioAgNP e 6) OEM + OEO. Por fim, o ponto central representa uma mistura ternária de proporções iguais dos três ativos (1:1:1) e 7) OEM + bioAgNP + OEO.

Tabela 1 - Descritivo das matérias-primas utilizadas nas formulações, suas respectivas fases, denominação comercial, INCI name, função e fornecedor.

Fase	Nome químico	INCI Name	Função	Fornecedor
1	Água	Water/aqua	Veículo	-
1	EDTA	Disodium EDTA	Agente quelante	Biovital
1	Copolímero de acriloldimetiltaurato	Ammonium Acryloyldimethyltaurate/VP Copolymer	Espessante	PharmaSpecial
1	Glicerina	Glycerin	Hidratante	Infinity Pharma
2	Olivato cetearílico e Olivato de sorbitano	Cetearyl Oliviate (and) Sorbitan Oliviate	Cera autoemulsionante não-iônica O/A	Atiká
2	Éster do óleo de oliva	Olive Oil PEG-7 Esters	Emoliente	Biovital
2	Triglicérides de ácido cáprico e caprílico	Triglicérides de ácido cáprico e caprílico	Emoliente	Atiká
2	Óleo de amêndoas doce	Prunus Amygdalus Dulcis (Sweet almond) Oil	Emoliente	PharmaSpecial
2	Butilhidroxitolueno (BHT)	ButilHidroxiTolueno	Antioxidante	PharmaSpecial
3	Alantoína	Allantoin	Regenerador	Infinity Pharma
3	Propilenoglicol	Propylene Glycol	Umectante	Synth
4	Vitamina E	Tocopheryl Acetate	Antioxidante	Alianza Magistral
5	Ciclometicone	Cyclomethicone	Emoliente	PharmaSpecial
6	Fenoxietanol e metilisotiazolinona	Phenoxyethanol (and) Methylisothiazolinone	Conservante	Embacaps

7	OEM	<i>Melaleuca alternifolia</i>	Ativo	Ferquima
7	bioAgNP	Nanopartículas de prata	Ativo	LAMIC e LAMEA
7	OEO	<i>Origanum vulgare</i>	Ativo	Ferquima

Fonte: o próprio autor.

Para o desenvolvimento das formulações, primeiramente manipulou-se a formulação base (FB) e depois adicionou-se os ativos antifúngicos. Para o desenvolvimento da FB, a fase aquosa (1) sem o copolímero foi aquecida a 70 ± 2 °C, e ao atingir a temperatura, o copolímero foi adicionado sob forte agitação. As fases aquosas (1) e oleosa (2) foram aquecidas separadamente a 75 ± 2 °C e invertidas (fase 2 sobre 1). Após resfriamento para 40 ± 2 °C, adicionou-se as demais fases. Ao final, ajustou-se o pH entre 5,0 e 6,5 de todas as formulações.

Foram formuladas oito emulsões O/A, sendo uma formulação base (controle) e sete formulações de tratamento, variando os ativos. Os ativos OEM, bioAgNP e OEO, foram acrescentados conforme as concentrações definidas pelo planejamento experimental do tipo Simplex-centroide, com quantidade suficiente para (qsp) 100,0 mL conforme Tabela 2.

Tabela 2 - Composição de sete formulações de emulsão contendo OEO, OEM e bioAgNP, isoladamente e/ou em associação e uma formulação base (F_{base}), que foi isenta de ativos.

Compo- sição	Formulação (%; v/p)							
	F_{OEM} (1)	$F_{bioAgNP}$ (2)	F_{OEO} (3)	$F_{OEM;bioAgNP}$ (4)	$F_{OEO;bioAgNP}$ (5)	$F_{OEM;OEO}$ (6)	$F_{OEM;bioAgNP;OEO}$ (7)	F_{base} (8)
OEM	3,0	-	-	1,5	-	1,5	1,0	-
bioAgNP		3,0	-	1,5	1,5	-	1,0	-
OEO	-	-	2,0	-	1,0	1,0	0,67	-
F_{base}	q.s.p 100	q.s.p 100	q.s.p 100	q.s.p 100	q.s.p 100	q.s.p 100	q.s.p 100	q.s.p 100

Legenda: OEM: Óleo essencial de *M. alternifolia*; bioAgNP: Nanopartículas de prata biogênicas; OEO: Óleo essencial de *O. vulgare*; F_{base} : Formulação base; F_{OEM} : Formulação com OEM 3%; $F_{bioAgNP}$: Formulação com bioAgNP 3%; F_{OEO} : Formulação com OEO 2%; $F_{OEM;bioAgNP}$: Formulação com OEM

1,5% e bioAgNP 1,5%; F_{OEO;bioAgNP}: Formulação com bioAgNP 1,5% e OEO 1,0%; F_{OEM;OEO}: Formulação com OEO 1,0% e OEM 1,5%; F_{OEM;bioAgNP;OEO}: Formulação com OEM 1,0%, OEO 0,67%, bioAgNP 1,0%.
Fonte: o próprio autor.

4.4 CARACTERIZAÇÃO FARMACOTÉCNICA DAS FORMULAÇÕES

As formulações foram avaliadas quanto às características organolépticas (aspecto, cor e odor) e ensaios físico-químicos (centrifugação, pH, densidade e espalhabilidade). Os testes foram realizados em triplicata para cada formulação e as médias calculadas (Brasil, 2008).

4.4.1 Análise de Pré-Estabilidade (Centrifugação)

As amostras foram submetidas ao teste da centrifugação, em triplicata, onde 5 g de cada formulação foi acondicionada em tubo de ensaio cônico, graduado e centrifugadas (Centrífuga Baby I Fanem 206-BL, São Paulo, Brasil) a 3200 rpm por 30 min à temperatura ambiente, para detectar visíveis modificações ou instabilidades como separação de fases, formação de sedimento compacto e coalescência. Em seguida, realizou-se a avaliação visual das formulações (Brasil, 2004).

4.4.2 Avaliação da Estabilidade Preliminar das Formulações

Os ensaios de Estabilidade Preliminar das formulações desenvolvidas foram realizados de acordo com o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (Brasil, 2004). O período de duração do teste foi de 15 dias (7 ciclos), sendo as análises realizadas no tempo zero (24 h) e após 15 dias no ciclo gelo-degelo. As condições de armazenamento das amostras foram 24 h em estufa (40 ± 2 °C) e 24 h em geladeira (5 ± 2 °C). Os parâmetros organolépticos e físico-químicos foram avaliados no tempo zero e após 15 dias de cada amostra. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.4.3 Análise Organoléptica

Observou-se o aspecto das formulações macroscopicamente após 24 h em repouso. Nessa análise, observa-se visualmente, se as amostras em estudo mantiveram as características macroscópicas da amostra padrão (F_{base}), ou se ocorreram alterações do tipo separação de fases, precipitação e turvação.

Realiza-se então, a análise de cor das formulações, em triplicata, por colorimetria. Compara-se visualmente, sob luz branca, a cor da amostra com a cor do padrão (F_{base}), armazenado nas mesmas condições e embalagem que a amostra das formulações com ativos (F_{OEM} , $F_{bioAgNP}$, F_{OEO} , $F_{OEM;bioAgNP}$, $F_{OEO;bioAgNP}$, $F_{OEM;OEO}$, $F_{OEM;bioAgNP;OEO}$).

A análise visual da cor da amostra foi realizada com 1,5 g da amostra acondicionada em vidro relógio, colocada sobre fundo branco. Em seguida, foi fotografada e seus resultados comparados.

O odor das amostras foi comparado com o odor da formulação padrão (F_{base}), diretamente através do olfato.

Nas análises de cor e odor, as amostras foram classificadas como normal, sem alteração, levemente modificada, modificada ou intensamente modificada.

4.4.4 Ensaio Físico-Químicos

Para as análises das características físico-químicas, verificou-se, em triplicata, os valores de pH, densidade e espalhabilidade.

4.4.4.1 Determinação do potencial hidrogeniônico (pH)

Para cada formulação, determinou-se o pH utilizando o phmetro digital (pH 21 pH/mV meter- HANNA, Brasil) em temperatura ambiente ($25 \pm 5^\circ\text{C}$), calibrado com solução tampão (pH 4,0 e 7,0). O eletrodo foi inserido na amostra diluída 1:10 com água purificada (Brasil, 2008).

4.4.4.2 Determinação da densidade

A densidade foi avaliada utilizando-se picnômetro de vidro, com capacidade de 10 mL. As formulações foram diluídas 1:10 em água purificada. Primeiramente, determinou a massa do picnômetro vazio com tampa e anotou-se o valor da massa. Depois, foi determinada a massa do picnômetro somente com água purificada e o valor foi anotado. Por último, pesou-se o picnômetro com a formulação diluída 1:10 e anotou-se o valor da massa. O valor relação entre a massa da amostra e a massa da água representa a densidade específica da amostra ensaiada. Para o cálculo foi utilizado a equação 1:

$$d = \frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0} \text{ (Equação 1)}$$

Onde, d é a densidade (g/cm^3), M_0 a massa do picnômetro vazio (g), M_1 a massa do picnômetro com água (g), e M_2 a massa do picnômetro com a formulação (g).

4.4.4.3 Determinação da espalhabilidade

Para a determinação da espalhabilidade, foi empregada a metodologia descrita por Müller & Guterres (1999). São utilizadas placas de vidro sobre uma escala de papel milimetrado, a fim de determinar a superfície que a amostra abrange através da medição dos diâmetros perpendiculares, com posterior cálculo do diâmetro médio, na temperatura de 25 ± 2 °C. Os cálculos foram realizados a partir da equação 2:

$$E_i = \frac{[(d_i)^2 \cdot \pi^4]}{4} \text{ (Equação 2)}$$

Onde E_i (mm^2) é a espalhabilidade da amostra para massa i , e d é o diâmetro médio (mm) alcançado pela amostra após a sobreposição de cada placa. Os valores da espalhabilidade em função dos pesos adicionados, foram determinados em triplicata, calculando-se a média.

4.5 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA ANTIFÚNGICA DAS FORMULAÇÕES

4.5.1 Curva de Sobrevivência

O ensaio de tempo de morte foi realizado para testar o efeito antifúngico das formulações desenvolvidas, incluindo a FB, e de Cetoconazol 20 mg/g (EMS S/A, Hortolândia/SP) como controle, contra *M. pachydermatis*. O teste foi realizado seguindo a metodologia descrita por Scandorieiro e colaboradores (2023) com adaptações.

Para análise da atividade antifúngica, 500 mg de cada formulação foram adicionados à placa de Petri (diâmetro de 100 mm), e espalhados por toda a superfície com auxílio de alça de Drigalski até formar uma camada homogênea. Posteriormente, foi preparado um inóculo de *M. pachydermatis*, de aproximadamente 1×10^5 UFC/mL em PBS 1%, e uma alíquota de 100 μ L dessa suspensão foram inoculados com o auxílio de alça de Drigalski em todas as placas de Petri já contendo a formulação desenvolvida e o antifúngico comercial. Em cinco pontos de tempo 0 h, 30 min, 2 h, 8 h, 24 h e 48 h de tratamento a 37 ± 2 °C, as placas de Petri foram lavadas com 1 mL de PBS para recuperar as leveduras sobreviventes. A suspensão recuperada foi diluída serialmente em PBS e sub cultivada em ágar YPD para determinação de UFC/mL. O teste foi realizado em triplicata.

4.5.2 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), a cepa de *M. pachydermatis* foi exposta a dois tratamentos diferentes: F_{base} (controle) e a formulação com melhor ação antifúngica encontrada pela técnica de curva de sobrevivência. A análise foi realizada seguindo a metodologia descrita por Scandorieiro e colaboradores (2022) com adaptações.

A cepa de *M. pachydermatis* foi cultivada em caldo YPD por 24 h a 37 ± 2 °C. Após esse período, a solução foi centrifugada, o sobrenadante foi retirado e o *pellet* com *M. pachydermatis* foi ressuspenso em 5 mL de caldo YPD e 0,5 g das formulações de tratamento (F_{base} e formulação com ativo), por 24 h a 37 ± 2 °C. As amostras foram centrifugadas 5 vezes a 5.000 rpm, por 15 min a 25 ± 2 °C, e

ressuspensas 5 vezes em PBS para que fossem retiradas todas as partículas indesejadas da formulação nas amostras de análise. O último *pellet* foi ressuspenso em solução fixadora de tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) contendo 2,5% (v/v) de glutaraldeído e 2% (v/v) de paraformaldeído.

Posteriormente, 0,20 mL de suspensões de cada amostra foram colocadas em lâminas de vidro revestidas com poli-L-lisina (Sigma-Aldrich), com posterior aplicação da solução fixadora e secagem completa. Após secagem, as amostras foram fixadas 3 vezes (3 lavagens de 10 min cada) por imersão em 1 ml de tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) contendo 2,5% (v/v) de glutaraldeído e 2% (v/v) de paraformaldeído. As células pós-fixadas foram desidratadas em gradiente de etanol (Sigma-Aldrich) (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 °GL), secas em ponto crítico usando CO₂ (BALTEC CPD 030 Critical Point Dryer), revestidas com ouro (BALTEC SDC 050 Sputter Coater) e observadas em microscópio eletrônico de varredura (FEI Quanta 200).

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises foram realizadas no ambiente R (R Core Team, 2022). Inicialmente, foi realizado o teste de normalidade pelo teste de Shapiro–Wilk. Após constatada a normalidade das amostras, foi utilizada análise de variância (ANOVA) de um fator com posterior teste de Tukey com significância de 5%.

Para analisar a semelhança de estabilidade entre as amostras, produzido um dendograma por distância Euclidiana com base nos resultados de pH e espalhabilidade através do pacote “*Vegan*” (Oksanen *et al.*, 2022), sendo previamente realizada uma análise de correlação cofenética que teve resultado de 0.9431169, indicando a confiabilidade da análise.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA BIOGÊNICAS

5.1.1 Síntese das bioAgNP

A biossíntese das bioAgNP foi realizada pela abordagem “*Bottom-up*”, utilizando compostos bioativos presentes no fungo filamentoso *Lichtheimia ornata*. O filtrado fúngico desses compostos foi preparado em solução aquosa e incubado a 28 °C, juntamente com o sal AgNO_3 para que ocorresse a redução dos íons Ag^+ em Ag^0 . A Figura 21 mostra a mudança de coloração observada no processo de obtenção das bioAgNP após 4 dias de incubação da suspensão fúngica com o sal AgNO_3 .

Figura 21 – Mudança de coloração observada pela redução de Ag^+ em Ag^0 , resultando em formação das bioAgNP, utilizando extrato fúngico de *L. ornata* como agente redutor.



Legenda: (1) Controle: Filtrado fúngico sem AgNO_3 ; (2) bioAgNP: Solução em cor marrom escuro após 4 dias de reação com AgNO_3 , indicando a formação das bioAgNP.

A mudança de coloração com o passar dos dias, indica a possível formação de nanopartículas em solução coloidal. Portanto, é necessário realizar a caracterização das bioAgNP para confirmar a presença de partículas na escala nanométrica.

Roy *et al.* (2019) e Guilger-Casagrande e Lima (2019) propõem que a redução de íons Ag^+ para Ag^0 ocorre pela reação dos íons prata com enzimas/proteínas, aminoácidos, polissacarídeos e vitaminas presentes no extrato fúngico. O mecanismo mais aceito é baseado pela presença da enzima “nitrito redutase”, a qual converte nitrito (NO_2^-) em nitro (NO_3^-). No processo de conversão das enzimas nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH/ NADPH) em $\text{NADP}^+/\text{NAD}^+$, o elétron é transferido para o íon prata (Ag^+), reduzindo para prata metálica (Ag^0). As enzimas NADH e nitrito redutase são consideradas as mais importantes na síntese biogênica de nanopartículas metálicas.

Durán e colaboradores (2005) sintetizaram bioAgNP a partir do fungo filamento *Fusarium oxysporum*, e sugeriram que a redução dos íons prata ocorreu pela ação da enzima redutase e das antraquinonas (quinonas oxidantes e eletrofílicas). Em um estudo de Kumar *et al.* (2007), enzimas nitrito redutase dependentes de NADH e quinonas, também foram responsáveis pela formação de nanopartículas.

5.1.2 Caracterização das bioAgNP

5.1.2.1 Detecção por espectrofotometria no UV-Vis

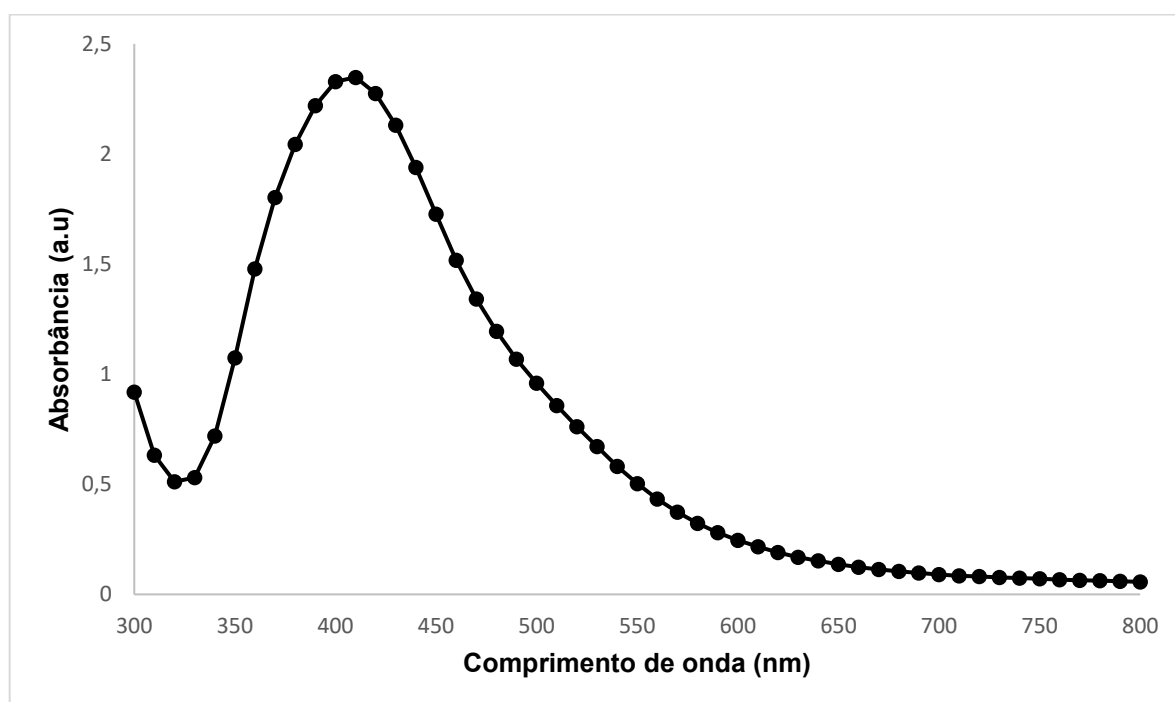
Após a ocorrência de redução, o filtrado muda de cor, passando de amarelo claro para marrom escuro. Essa mudança de coloração ocorre quando o tamanho das partículas aumenta, ou seja, quando ocorre a junção de unidades menores (blocos de construção de átomos, moléculas) em estruturas maiores (agregados nanométricos). As variações de cores são devidas à ressonância plasmônica de superfície (RPS), uma excitação coletiva dos elétrons, que ao interagirem com os fótons de luz incidentes, promove sua transição para um estado de maior energia. A RPS reflete na alteração das propriedades ópticas do material

que se encontra na região visível do espectro eletromagnético, e determina o comprimento de onda que absorve sua própria cor (Noah, 2018; Guilger-Casagrande; Lima, 2019; Morandi, 2023).

Na detecção por espectrofotometria no UV-vis, a absorbância do metal prata ocorre na faixa de 400 - 450 nm, confirmando a redução de Ag^+ a Ag^0 metálico. Pico de absorbância em comprimento de onda maior, indica a presença de nanopartículas maiores (Elamawi et al., 2018; Noah, 2018). A variação de tamanho depende de parâmetros de síntese, bem como espécie de fungo, temperatura, pH e meio de dispersão (Khandel; Shahi, 2018; Lee; Jun, 2019).

Em relação aos resultados obtidos neste trabalho, as bioAgNP sintetizadas a partir de extrato fúngico de *L. ornata*, obtiveram um pico de absorção em 410 nm por espectrofotometria no UV-Vis (Figura 22). O comprimento de onda encontrado para as bioAgNP está próximo ao valor encontrado nos estudos dos autores Bocate *et al.* (2019) e Scandorieiro *et al.* (2023), que também sintetizaram bioAgNP por extrato fúngico, sendo de 445 nm e 420 nm, respectivamente.

Figura 22 - Gráfico de detecção por espectrofotometria no UV-Vis das bioAgNP sintetizadas por *L. ornata*. O pico de absorbância em 410 nm indica a obtenção de bioAgNP.



5.1.2.2 Espalhamento dinâmico da luz (DLS) e potencial zeta

A técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) foi utilizada para medir o diâmetro das bioAgNP, considerando a distribuição de tamanho da partícula em função da intensidade, área, volume e quantidade. O tamanho das bioAgNP foi medido através do equipamento ZetaSizer Nano-ZS (Mendes *et al.*, 2014).

Pelo DLS é possível observar o padrão de flutuações da intensidade da luz espalhada por um determinado ângulo e um volume fixo iluminado, a fim de identificar o tamanho das partículas da solução e seu índice de polidispersividade (IPD). O IPD determina o grau de uniformidade de uma distribuição de tamanho de partículas, podendo variar de 0 a 1. O IPD é um número calculado em que valores inferiores a 0,05 indicam que as partículas são monodispersivas, ou seja, apresentam uniformidade de tamanho. Quanto menor o IPD, mais monodisperso, e conseqüentemente, mais homogêneas são as nanopartículas sintetizadas (Reis, 2019; Garcia *et al.*, 2021).

O Potencial Zeta (ζ) ou potencial de superfície, é um termo utilizado em coloides e físico-química para se referir ao potencial elétrico existente na superfície de uma partícula suspensa em um líquido. Neste cenário em que uma partícula coloidal está suspensa em meio líquido, existe uma diferença de potencial elétrico entre a superfície da partícula e o líquido circundante, ocasionada pela adsorção de íons na superfície dessa partícula. O potencial ζ mede a diferença de potencial elétrico entre a superfície da partícula e o líquido circundante. Com isso, o potencial ζ avalia a estabilidade da suspensão coloidal mensurando a carga superficial dessas partículas, correlacionando a repulsão eletrostática entre as NPs e a estabilidade de sistemas coloidais. Valores de potencial ζ elevados mostram que as partículas se repelirão, a fim de evitar aglomeração para manter uma suspensão estável (Garcia *et al.*, 2021; Oliveira, 2023).

NPs são consideradas estáveis com potencial ζ menor que -30 mV ou maior que +30 mV; na faixa de +100 mV a -100 mV, e valores maiores que +25 mV ou menores que -25 mV, indicando alto grau de estabilidade. Algumas diretrizes classificam a faixa de -20 mV a +30 mV como moderadamente estáveis (Bhattacharjee, 2016; Reis, 2019; Shnoudeh *et al.*, 2019; Garcia *et al.*, 2021).

A análise de dados por DLS, mostrou que o tamanho médio das bioAgNP sintetizadas neste trabalho foi de 29,93 nm, IPD de 0,338 e potencial ζ de

-9,95 mV. Foram sintetizadas bioAgNP em escala nanométrica (1 – 100 nm) e com IPD superior a 0,05. O resultado obtido pelo IPD suplementa com as análises evidenciadas por produção em sistemas biológicos de alta polidispersidade (Reis, 2019).

No estudo realizado por Reis (2019), em que o autor sintetizou nove nanopartículas de prata pela cepa de *L. ornata* produzidas com diferentes meios de cultura, os resultados obtidos por DLS foram de 53,60, 54,77, 56,84, 70,49, 93,05, 102,30, 101,08, 121,57 e 175,40 nm. No mesmo estudo, os IPDs das bioAgNP variaram de 0,24 a 0,49, e os potenciais ζ de -11,2 a -23,7 mV. As bioAgNP sintetizadas por Reis (2019) apresentaram variações de tamanhos e alta polidispersividade, evidenciando a variação de resultados que podem ocorrer pela síntese biológica de NPs.

5.1.2.3 Espectroscopia na região do infravermelho por transformada fourier (FTIR)

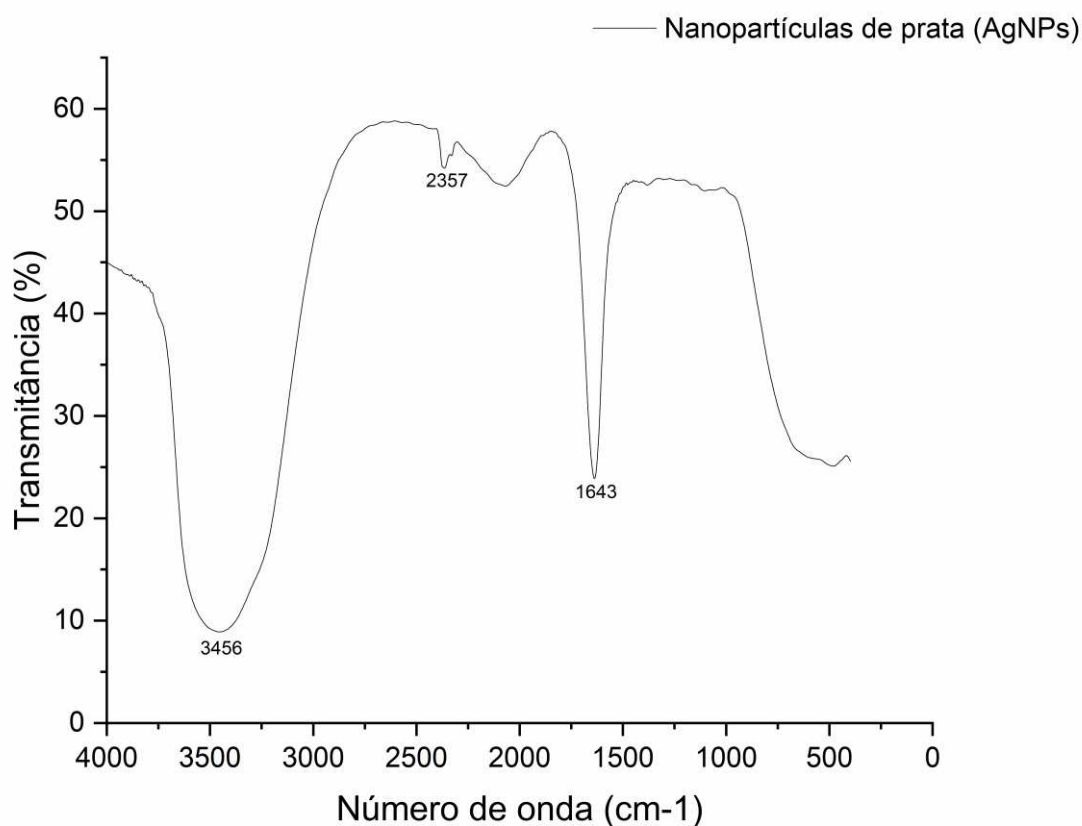
Análises por espectroscopia de FTIR são realizadas para identificar e classificar prováveis biomoléculas (grupos funcionais) ligadas à superfície das NPs, responsáveis pela síntese e estabilidade. Os grupos funcionais existentes na superfície das NPs são identificados a partir das ligações químicas entre os átomos, de modo que cada ligação apresenta um comprimento de onda específico. A identificação dos grupos funcionais ocorre por meio de vibrações, após absorverem o comprimento de onda na faixa de 4000 - 400 cm^{-1} (Noah, 2018; Shnoudeh *et al.*, 2019; Kumar; Prasad, 2021).

A Figura 23 demonstra o gráfico obtido pela técnica de FTIR para a síntese de bioAgNP deste trabalho. Observa-se a presença de bandas nos comprimentos de onda 3456, 2357 e 1643 cm^{-1} na síntese de bioAgNP. A faixa em 3456 cm^{-1} representa o grupamento hidroxila (O-H); a banda em 2357 cm^{-1} indica a presença de dióxido de carbono (O=C=O); e em 1643 cm^{-1} , os ligamentos alceno (C=C), carboxila de amida (C=O) e imina (C=N) (Sigma Aldrich, 2023). Por se tratar de análises qualitativas, não é possível determinar a quantidade exata de proteínas presentes na amostra pelas análises de espectroscopia de FTIR (Reis, 2019).

Segundo estudos de Noah (2018), numerosos extratos orgânicos de sínteses de NPs biogênicas de prata e ouro, os grupos funcionais aminas e carboxilato

foram identificados e propostos como possíveis agentes redutores orgânicos ou agentes de cobertura (estabilidade) destas NPs.

Figura 23 - Espectroscopia por FTIR das bioAgNP sintetizadas a partir de *L. ornata*.



Legenda: As bandas em 3456 cm^{-1} , 2357 cm^{-1} e 1643 cm^{-1} , indicam a presença de grupamento hidroxila (O-H), dióxido de carbono (O=C=O) e ligamentos alceno (C=C), amida (C=O) e imina (C=N), respectivamente.

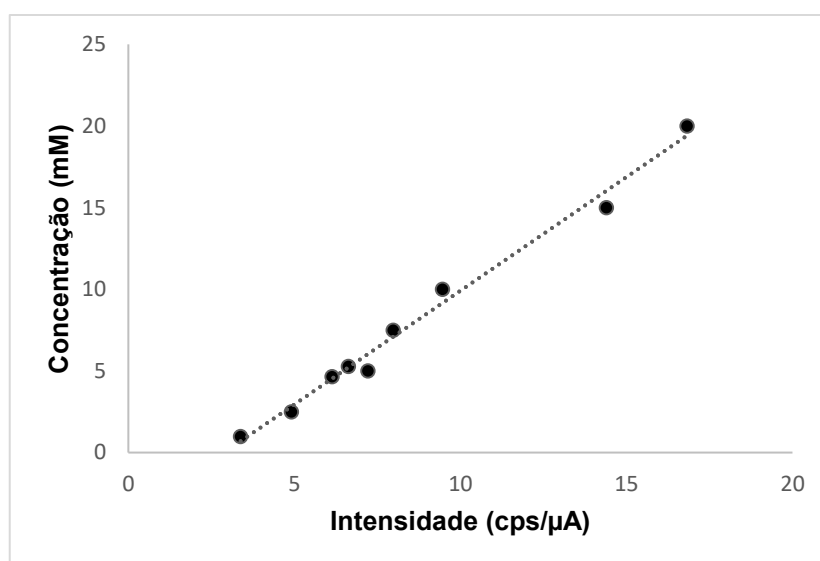
5.1.2.4 Fluorescência de raios X por dispersão em energia (EDXRF)

A técnica de EDXRF é utilizada para detectar os elementos químicos presentes na amostra, pelo fornecimento de espectros com picos relacionados aos elementos de análise e pelo mapeamento da sua distribuição. Dessa forma, é possível confirmar a obtenção de nanopartículas metálicas (Shnoudeh *et al.*, 2019).

Os resultados de EDXRF (Figura 24) são obtidos por uma regressão linear simples resultante da correlação da intensidade (cps/ μA) e concentração dos padrões AgNO_3 (mM) com as amostras (bioAgNP). Para a caracterização das

bioAgNP, foi extraída a equação da reta $y = 1,3964x - 4,0884$ obtendo valor de concentração de 4,65 mM (502,2 $\mu\text{g/mL}$).

Figura 24 - Curva padrão determinada com soluções de AgNO_3 (mM) (padrão) para determinar a concentração das bioAgNP. A correlação das soluções padrão e a amostra contendo bioAgNP, resulta em uma reta pelo método de regressão linear que determinou a concentração das bioAgNP em 4,65 mM.



Os coeficientes de determinação (R^2) variaram entre 0,98 e 0,99, indicando que mais de 98% da variabilidade dos dados pode ser explicada pelo modelo. Valores de R^2 altos, próximos de 1 como os encontrados, indica que a regressão linear foi eficiente para determinar a concentração das bioAgNP a partir da intensidade e concentração das soluções padronizadas.

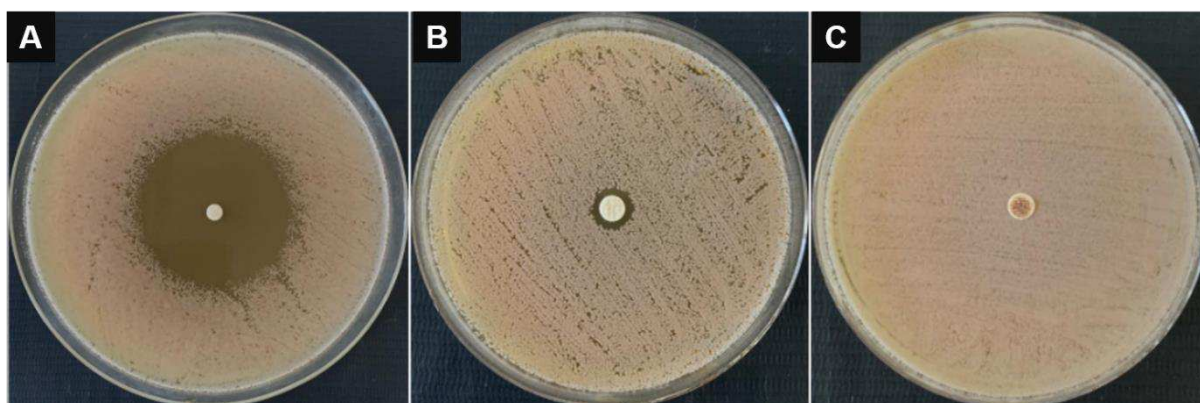
5.2 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA ANTIFÚNGICA DOS ANTIMICROBIANOS

5.2.1 Efeito Antifúngico dos Ativos Individuais pelo Ensaio de Disco-difusão

Os ativos antifúngicos de estudo, OEO, OEM e bioAgNP, foram avaliados individualmente pelo ensaio de disco-difusão, e os resultados estão representados na Figura 25. Os discos foram dispostos sobre a placa após semar a

levedura *M. pachydermatis*, e então, 10 μ L dos ativos puros (sem diluição) foram aplicados sobre os discos.

Figura 25 – Resultados visuais da inibição de crescimento do contato dos ativos antifúngicos individuais com a cepa de *M. pachydermatis*.



Legenda: A) Disco com 10 μ L de OEO: Óleo essencial de *O. vulgare* com densidade entre 0,935 – 0,970 g/cm³; B) Disco com 10 μ L de OEM: Óleo essencial de *M. alternifolia* com densidade entre 0,885 – 0,906 g/cm³; C) Disco com 10 μ L de bioAgNP: Nanopartículas de prata biogênicas na concentração de 502,2 μ g/mL.

De acordo com a Figura 25, os ativos que tiveram ação antifúngica contra *M. pachydermatis* foram OEO e OEM, com médias de diâmetros da zona de inibição de $53 \pm 3,5$ mm e $10 \pm 0,0$ mm, respectivamente. Bismark e colaboradores (2019), avaliaram a atividade antifúngica dos OEs de *O. vulgare* e *M. alternifolia* contra *M. pachydermatis*. Os autores obtiveram os seguintes diâmetros de zona de inibição: 21 - >40 mm para o OE de orégano; 6 – 17,5 mm para o OE de melaleuca.

O ensaio de disco-difusão avalia o efeito antifúngico qualitativamente pela zona de inibição no ágar contendo meio de cultivo. A ação antifúngica dos OEs, está diretamente relacionada à composição dos mesmos (Debiagi *et al.*, 2020). Os óleos OEO e OEM são compostos voláteis de composição específica. OEO é composto majoritariamente pelo monoterpene fenólico carvacrol (72%), e OEM pelos monoterpenos terpineno-4-ol (41%) e γ -terpineno (21%) (Dewick, 2022; Ferquima, 2023). Dessa forma, é possível observar a diferença de ação antifúngica entre os OEs de *O. vulgare* e *M. alternifolia*, de modo que OEO apresentou maior controle efetivo contra *M. pachydermatis* quando comparado com OEM.

Já para as bioAgNP, não foi detectada a inibição de crescimento de *M. pachydermatis* pelo ensaio de disco-difusão, porém a ação antifúngica das bioAgNP já é comprovada pela literatura. Fonseca *et al.* (2022), avaliou a

suscetibilidade de bioAgNP contra vinte espécies de *Candida* spp. isoladas da cavidade oral, e quinze espécies apresentaram efeito fungistático. As bioAgNP são amplamente utilizadas principalmente em formulações de uso tópico para tratamento de dermatite atópica, formulação de antimicrobianos com atividade antifúngica, antibacteriana, antiviral (Valente *et al.*, 2020).

De acordo com Araújo (2019), as placas contendo ágar não apresentam quantidades significativas de água para que haja a difusão do agente ativo no meio, conseqüentemente, gera menores halos de inibição para prata. Portanto, testes mais sensíveis como CIM e CFM foram realizados, a fim de obter resultados mais precisos de ação antifúngica dos ativos escolhidos.

5.2.2 Determinação de CIM e CFM dos Antimicrobianos Individualmente

Os valores médios obtidos para CIM e CFM dos ativos individuais (OEO, OEM e bioAgNP) contra *M. pachydermatis* estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Valor médio da concentração inibitória mínima (CIM) e fungicida mínima (CFM) dos ativos individuais (OEO, OEM e bioAgNP) contra *M. pachydermatis*.

Teste	Bioativos Antimicrobianos		
	OEO (mg/mL)	OEM (mg/mL)	bioAgNP (µg/mL)
CIM	0,625 ± 0,0	5,0 ± 0,11	1,96 ± 0,0
CFM	1,25 ± 0,0	5,0 ± 0,11	1,96 ± 0,0

Legenda: OEO: Óleo essencial de *O. vulgare*; OEM: Óleo essencial de *M. alternifolia*; bioAgNP: Nanopartículas de prata biogênicas.

Santin e colaboradores (2014), avaliaram a CIM e CFM para 42 isolados de *M. pachydermatis* e encontraram valores que variaram de $\leq 0,87$ a 7 mg/mL para OEO. Ebaní e colaboradores (2020), encontraram CIMs que variaram de 0,29 a 0,58 mg/mL para OEO contra *M. pachydermatis*. As faixas de CIM e CFM estão próximas ou dentro do valor obtido para OEO (0,625 mg/mL e 1,25 mg/mL) neste estudo, comprovando assim, a eficácia do ensaio desenvolvido.

Para OEM, o valor de CIM e CFM foi de 5,0 mg/mL, ou 0,5 % (v/v), valor dentro de faixas obtidas pela literatura de Carson, Hammer e Riley (2006), com CIM de 0,16 a 0,5 % (v/v) e CFM de 0,06 a 0,5 % (v/v) para OEM contra espécies de *Malassezia* spp.

Por fim, a CIM e CFM para bioAgNP foi de 1,93 µg/mL, valor próximo a CIM encontrada por Morandi (2023), que foi de 1 µg/mL para *M. pachydermatis*.

5.2.3 Interação Antifúngica dos Antimicrobianos em Combinações Binárias

O teste de interação dos ativos em combinações binárias foi realizado por meio da microdiluição em caldo, assim como o de CIM, e os resultados obtidos estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 – Concentração Inibitória Mínima em combinação ($CIM_{\text{combinação}}$), índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) e interação dos ativos OEO, OEM e bioAgNP, observados pelo ensaio de combinação (*Checkerboard*).

Combinações	<i>Checkerboard</i>			
	$CIM_{\text{combinação}}$ (mg/mL)	CIF	ICIF	Interação
OEO	0,3	0,48	0,98	Aditismo
OEM	2,5	0,5		
OEO	0,3	0,48	0,48	Sinergismo
bioAgNP	0,0035 (µg/mL)	0,0017		
OEM	2,5	0,5	0,99	Aditismo
bioAgNP	0,979 (µg/mL)	0,49		

Legenda: OEO: Óleo essencial de *O. vulgare*; OEM: Óleo essencial de *M. alternifolia*; bioAgNP: Nanopartículas de prata biogênicas; $CIM_{\text{combinação}}$: Concentração Inibitória Mínima dos ativos em combinação; CIF: Concentração Inibitória Fracionada; $ICIF \leq 0,5$ indica sinergismo entre os compostos, $0,5 < ICIF \leq 1$ indica aditismo, $1 < ICIF \leq 4$ indica antagonismo.

Esse ensaio é importante para avaliar a eficácia antifúngica dos componentes OEO, OEM e bioAgNP em combinação, a fim de entender o efeito que cada um apresenta em relação ao outro, principalmente dentro das formulações. O ensaio de combinação avalia as combinações dos agentes antimicrobianos contra organismos em diluições seriadas duplas, a concentração de cada fármaco isoladamente e em combinação. A natureza da interação entre os dois antimicrobianos é então determinada por sinergismo, aditismo ou indiferença (Bellio *et al.*, 2021).

A partir dos resultados obtidos, é possível determinar a concentração inibitória fracionada (CIF) e então, encontrar o índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) e assim determinar a interação entre os compostos (Oliveira *et al.*, 2021).

Os resultados de interação obtidos entre as combinações testadas dos bioativos OEO x OEM; bioAgNP x OEO; bioAgNP x OEM foram de aditismo e sinergismo, conforme descrito na Tabela 5. As combinações entre OEO x OEM, e OEM x bioAgNP resultaram em interações de aditismo com ICIF de 0,98 e 0,99, respectivamente. Para a combinação OEO x bioAgNP, a interação foi de sinergismo com ICIF de 0,48.

O efeito sinérgico ocorre quando o efeito combinado é maior do que a soma dos efeitos das duas substâncias separadas, ou seja, os compostos em combinação intensificam a atividade inibitória. Quando o efeito combinado é igual à soma dos efeitos das substâncias individuais, as interações entre os antimicrobianos são aditivas. Em interações aditivas, a combinação não apresenta aumento na atividade inibitória ou um leve aumento devido ao efeito aditivo de ambos compostos combinados. Já quando o efeito combinado é menor que a soma das substâncias individuais, é determinado antagonismo, diminuindo a atividade inibitória dos compostos (Oliveira *et al.*, 2021).

Dessa forma, os resultados do ensaio de combinações apresentaram-se de acordo com as especificações para o teste, e foram encontradas interações desejáveis (sinergismo e aditismo) para a continuação do estudo.

5.3 CARACTERIZAÇÃO FARMACOTÉCNICA DAS FORMULAÇÕES

5.3.1 Teste de Pré-estabilidade, Ensaio Organolépticos e Físico-químicos

5.3.1.1 Teste de centrifugação

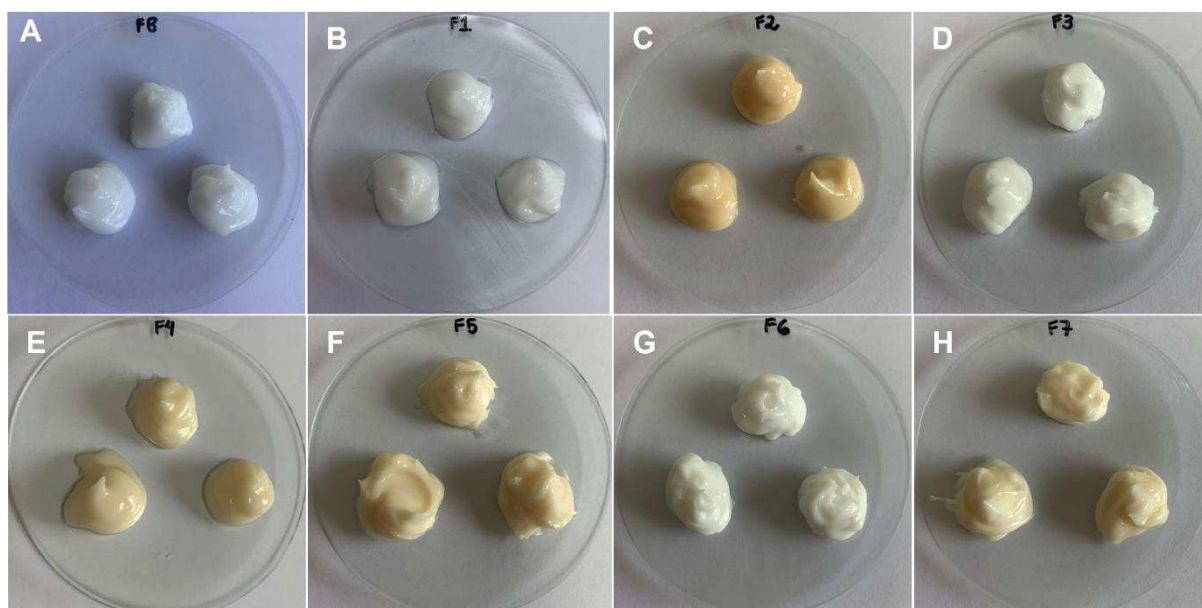
A centrifugação objetiva submeter a amostra a uma condição de estresse, simulando um aumento na força da gravidade por conta da alta rotação a que a amostra é submetida; logo, este teste permite antecipar instabilidades que possam futuramente sobrevir ao produto, manifestadas na forma de sedimentação, separação de fases ou coalescência (Brasil, 2007).

Da realização da análise visual ao fim do procedimento, observou-se que tanto as formulações quanto o controle mantiveram um aspecto homogêneo, ausente de quaisquer indícios de separação de fases ou precipitação, isto é, todas elas atestaram estabilidade e estão aptas a serem submetidas às caracterizações subsequentes.

5.3.1.2 Características organolépticas

Quanto às características organolépticas (Figura 26) da formulação controle (F_{base}), foi possível observar que esta apresentou-se sob a forma de um gel-creme homogêneo de coloração branca. Já as formulações contendo bioAgNP ($F_{bioAgNP}$, $F_{OEM;bioAgNP}$, $F_{OEO;bioAgNP}$ e $F_{OEM;bioAgNP;OEO}$) e OEO (F_{OEO}) diferiram de F_{base} em relação à cor e ao odor, sendo $F_{bioAgNP}$, $F_{OEM;bioAgNP}$, $F_{OEO;bioAgNP}$ e $F_{OEM;bioAgNP}$ com coloração caramelo devido à presença da bioAgNP, e F_{OEO} levemente amarelada por conta do OEO. As formulações F_{OEM} , F_{OEO} , $F_{OEM;bioAgNP}$, $F_{OEO;bioAgNP}$ e $F_{OEM;bioAgNP;OEO}$, apresentaram cheiro característico dos referidos óleos. Todas as formulações mantiveram o aspecto homogêneo do controle conforme pode ser observado na Tabela 5.

Figura 26 – Avaliação organoléptica das formulações desenvolvidas em triplicata.



Legenda: A) F_{base} : Formulação base; B) F_{OEM} : Formulação com OEM 3%; C) $F_{bioAgNP}$: Formulação com bioAgNP 3%; D) F_{OEO} : Formulação com OEO 2%; E) $F_{OEM;bioAgNP}$: Formulação com OEM 1,5% e bioAgNP 1,5%; F) $F_{OEO;bioAgNP}$: Formulação com bioAgNP 1,5% e OEO 1,0%; G) $F_{OEM;OEO}$: Formulação com OEO 1,0% e OEM 1,5%; H) $F_{OEM;bioAgNP;OEO}$: Formulação com OEM 1,0%, OEO 0,67%, bioAgNP 1,0%.

Tabela 5 – Características organolépticas e propriedades físico-químicas observadas após 24 h de manipulação das formulações desenvolvidas.

Características organolépticas e físico-químicas						
Formulação	Centrífuga	Cor	Odor	Aspecto	pH	Densidade (g/cm ³)
F_{base}	SSF	Branco	Carac. F_{base}	Viscoso e homogêneo	6,3 ± 0,003	10 ± 0,003
F_{OEM}	SSF	Branco	Carac.OEM	Viscoso e homogêneo	5,9 ± 0,08	10 ± 0,002
$F_{bioAgNP}$	SSF	Caramelo	Carac. F_{base}	Viscoso e homogêneo	5,6 ± 0,1	10 ± 0,002
F_{OEO}	SSF	Branco	Carac. OEO	Viscoso e homogêneo	5,5 ± 0,04	10 ± 0,002
$F_{OEM;bioAgNP}$	SSF	Bege	Carac. OEM	Viscoso e homogêneo	5,3 ± 0,03	10 ± 0,002
$F_{OEO;bioAgNP}$	SSF	Bege	Carac. OEO	Viscoso e homogêneo	5,3 ± 0,07	10 ± 0,003
$F_{OEM;OEO}$	SSF	Branco	Carac. OEM e OEO	Viscoso e homogêneo	5,2 ± 0,02	10 ± 0,004

$F_{OEM;bioAgNP;OEM}$	SSF	Bege	Carac. OEM e OEO	Viscoso e homogêneo	5,2 $\pm 0,03$	10 $\pm 0,01$
-----------------------	-----	------	---------------------	------------------------	-------------------	------------------

Legenda: SSF: Sem separação de fase; Carac. F_{base} : Característico da F_{base} ; Carac. OEM: Característico de *M. alternifolia*; Carac. OEO: Característico de *O. vulgare*; Carac. OEO e OEM: Característico de *O. vulgare* e *M. alternifolia*; F_{base} : Formulação base; F_{OEM} : Formulação com OEM 3%; $F_{bioAgNP}$: Formulação com bioAgNP 3%; F_{OEO} : Formulação com OEO 2%; $F_{OEM;bioAgNP}$: Formulação com OEM 1,5% e bioAgNP 1,5%; $F_{OEO;bioAgNP}$: Formulação com bioAgNP 1,5% e OEO 1,0%; $F_{OEM;OEO}$: Formulação com OEO 1,0% e OEM 1,5%; $F_{OEM;bioAgNP;OEO}$: Formulação com OEM 1,0%, OEO 0,67%, bioAgNP 1,0%.

De acordo com a Tabela 5, todas as formulações permaneceram estáveis após o teste de centrifuga, ou seja, não houve separação de fases, além do pH permanecer na faixa de 5,0 a 6,5, e densidade de 10 g/cm³.

O aspecto sensorial de um produto representa um parâmetro de avaliação de qualidade, implicando diretamente em sua aceitação pelo consumidor. As diferenças sensoriais observadas em diversos cosméticos são decorrentes do tipo de formulação, bem como de seus constituintes e embalagem usada para seu acondicionamento (Vieira, 2015). Sendo assim, como o produto em questão será utilizado com fim terapêutico, ao invés de estético, não há necessidade de adicionar pigmento à formulação.

5.3.1.3 Avaliação da estabilidade preliminar, ensaios organolépticos e físico-químicos

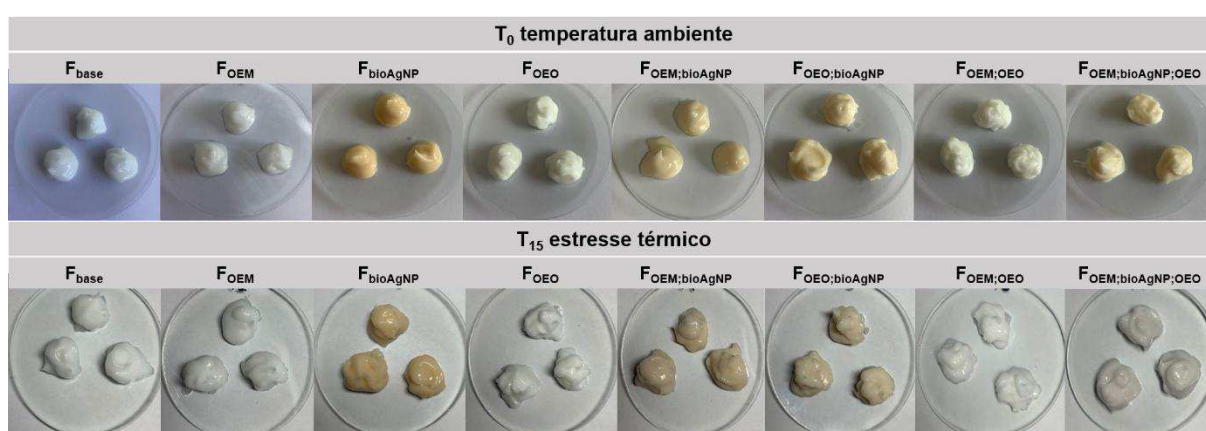
O estudo da estabilidade preliminar também visa à antecipação de futuras instabilidades, porém o faz por meio da submissão da amostra a condições extremas de temperatura, orientando a seleção daquelas mais aptas à formulação final do produto (Brasil, 2004).

Da observação das amostras ao fim do estudo (Figura 27) constatou-se que $F_{OEM;bioAgNP;OEO}$ apresentou alteração de cor. As formulações F_{OEM} , $F_{bioAgNP}$, F_{OEO} , $F_{OEM;bioAgNP}$, $F_{OEO;bioAgNP}$ e $F_{OEM;OEO}$ se mantiveram homogêneas, com a mesma coloração e sem quaisquer sinais de separação de fases ou precipitação, atestando assim a estabilidade delas mesmo frente ao estresse a que foram submetidas, conforme a Figura 27.

O pH de cada formulação encontra-se listado na Tabela 5, cujos valores mostraram-se próximos entre si e compatíveis com o valor observado para a pele, que é de aproximadamente 5,0 (Murdan; Milcovich; Goriparthi, 2011), e com a faixa de pH entre 5,0 e 6,5 aceita para o desenvolvimento das formulações.

A análise da densidade foi embasada na relação entre as densidades do analito e da água à temperatura de 20 °C (Brasil, 2008). Realizada a determinação, os valores obtidos estão listados na Tabela 6. Sabendo-se que a densidade é influenciada pela composição da amostra e que as formulações possuem a mesma base, diferenciando apenas dos ativos, verifica-se que tais ativos não influenciaram na densidade.

Figura 27 - Avaliação organoléptica das formulações após os 15 dias de avaliação da estabilidade preliminar.



Legenda: F_{base}: Formulação base; F_{OEM}: Formulação com OEM 3%; F_{bioAgNP}: Formulação com bioAgNP 3%; F_{OEO}: Formulação com OEO 2%; F_{OEM;bioAgNP}: Formulação com OEM 1,5% e bioAgNP 1,5%; F_{OEO;bioAgNP}: Formulação com bioAgNP 1,5% e OEO 1,0%; F_{OEM;OEO}: Formulação com OEO 1,0% e OEM 1,5%; F_{OEM;bioAgNP;OEO}: Formulação com OEM 1,0%, OEO 0,67%, bioAgNP 1,0%.

Tabela 6 – Estabilidade preliminar das formulações, onde foram analisados os parâmetros de cor, odor, aspecto, pH e densidade, após 15 dias em temperatura ambiente e 15 dias sob ciclo estresse térmico.

Estabilidade Preliminar das formulações								
Temperatura ambiente - T15 dias								
	F _{base}	F _{OEM}	F _{bioAgNP}	F _{OEO}	F _{OEM;bioAgNP}	F _{OEO;bioAgNP}	F _{OEM;OEO}	F _{OEM;bioAgNP;OEO}
Cor	N	N	N	N	N	N	N	LM
Odor	N	N	N	N	N	N	N	N
Aspecto	N	N	N	N	N	N	N	N
pH	5,3 ± 0,02	5,3 ± 0,03	5,4 ± 0,04	5,3 ± 0,10	5,1 ± 0,04	5,05 ± 0,04	5,04 ± 0,05	5,05 ± 0,02
Densidade (g/cm³)	10 ± 0,002	10 ± 0,002	10 ± 0,002	10 ± 0,005	10 ± 0,001	10 ± 0,004	10 ± 0,002	10 ± 0,003

Estresse térmico - T15 dias								
	F _{base}	F _{OEM}	F _{bioAgNP}	F _{OEO}	F _{OEM;bioAgNP}	F _{OEO;bioAgNP}	F _{OEM;OEO}	F _{OEM;bioAgNP;OEO}
Cor	N	N	N	N	N	N	N	M
Odor	N	N	N	N	N	N	N	N
Aspecto	N	N	N	N	N	N	N	N
pH	5,2 ± 0,04	5,2 ± 0,06	5,2 ± 0,09	5,1 ± 0,006	5,1 ± 0,07	5,1 ± 0,04	5,2 ± 0,05	5,1 ± 0,01
Densidade (g/cm³)	9,95 ± 0,001	10 ± 0,002	10 ± 0,001	10 ± 0,01	10 ± 0,001	10 ± 0,005	10 ± 0,01	10 ± 0,006

Legenda: N = Normal; M = Modificado; F_{base}: Formulação base; F_{OEM}: Formulação com OEM 3%; F_{bioAgNP}: Formulação com bioAgNP 3%; F_{OEO}: Formulação com OEO 2%; F_{OEM;bioAgNP}: Formulação com OEM 1,5% e bioAgNP 1,5%; F_{OEO;bioAgNP}: Formulação com bioAgNP 1,5% e OEO 1,0%; F_{OEM;OEO}: Formulação com OEO 1,0% e OEM 1,5%; F_{OEM;bioAgNP;OEO}: Formulação com OEM 1,0%, OEO 0,67%, bioAgNP 1,0%.

5.3.1.4 Determinação da espalhabilidade

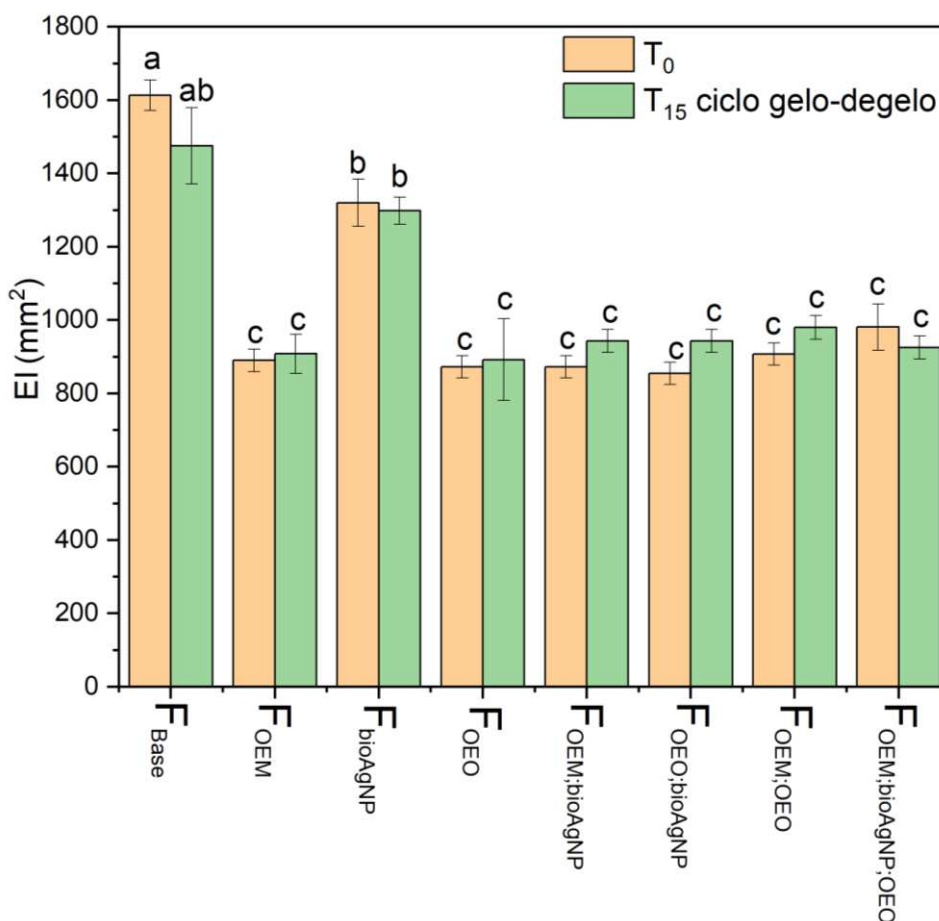
A avaliação da espalhabilidade das emulsões ocorreu por meio do método de placas paralelas e o ensaio foi realizado em triplicata.

A espalhabilidade das formulações foi determinada nos tempos zero e 15 dias após o estresse térmico, a fim de avaliar as características de estabilidade das formulações em relação à viscosidade. A Figura 28 demonstra as mudanças ocorridas nas formulações comparadas com o tempo zero.

De acordo com a Figura 28, após 15 dias sofrendo estresse térmico, as formulações F_{OEM}, F_{OEO}, F_{OEM;bioAgNP}, F_{OEO;bioAgNP} e F_{OEO;OEM} apresentaram-se menos viscosas do que no tempo zero. Os resultados de espalhabilidade obtidos após T₁₅ dias para estas formulações foram de: 908,0 mm² para F_{OEM}; 892,0 mm² para F_{OEO}; 943,6 mm² para F_{OEM;bioAgNP}; 943,6 mm² F_{OEO;bioAgNP}; 980,5 mm² F_{OEO;OEM}.

Em T₁₅, as formulações contendo os ativos apresentaram menor espalhabilidade em relação a F_{base} com espalhabilidade de 1475,3 mm². Das formulações com ativos, F_{bioAgNP} apresentou a melhor espalhabilidade quando comparado a base, com valor de espalhabilidade de 1298,4 mm² ($p < 0,05$), além de ser a única formulação a apresentar diferença significativa em termos de espalhabilidade pela ANOVA com posterior teste de Tukey ($p < 0,05$).

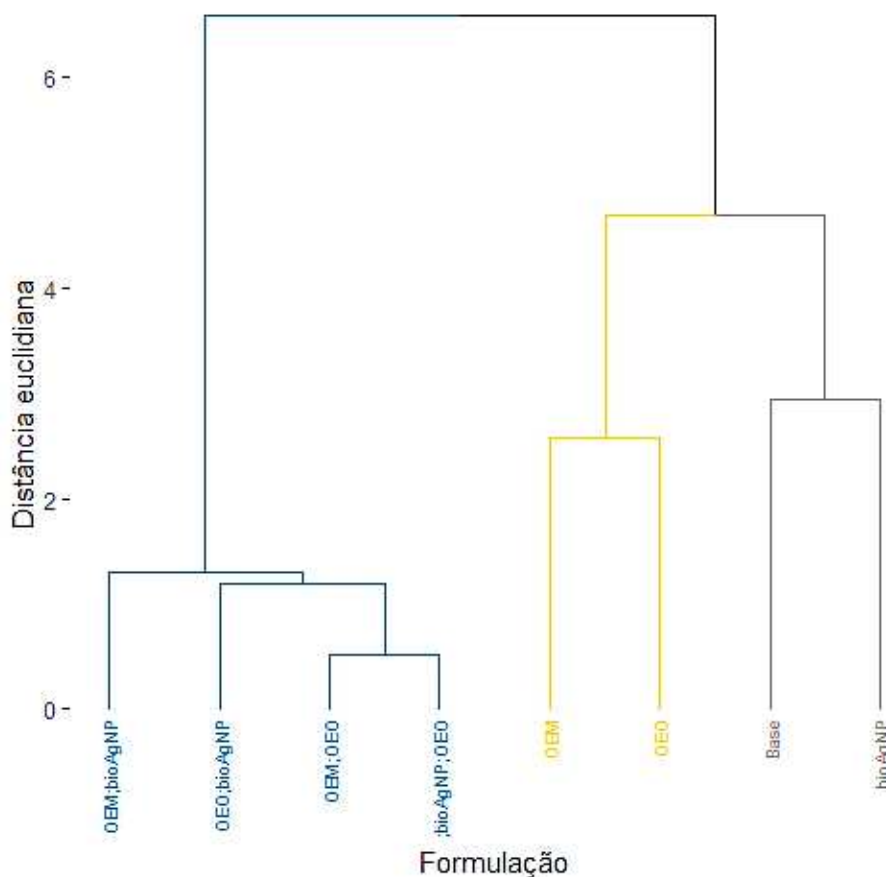
Figura 28 – Espalhabilidade das formulações no tempo zero (T_0) e após 15 dias no ciclo por estresse térmico (T_{15}). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0.05$) pelo teste Tukey.



Legenda: F_{base}: Formulação base; F_{OEM}: Formulação com OEM 3%; F_{bioAgNP}: Formulação com bioAgNP 3%; F_{OEO}: Formulação com OEO 2%; F_{OEM:bioAgNP}: Formulação com OEM 1,5% e bioAgNP 1,5%; F_{OEO:bioAgNP}: Formulação com bioAgNP 1,5% e OEO 1,0%; F_{OEM:OEO}: Formulação com OEO 1,0% e OEM 1,5%; F_{OEM:bioAgNP;OEO}: Formulação com OEM 1,0%, OEO 0,67%, bioAgNP 1,0%.

Para analisar a semelhança de estabilidade entre as amostras, foi produzido um dendograma por distância Euclidiana com base nos resultados de pH e espalhabilidade através do pacote “Vegan” (OKSANEN et al., 2022). O dendograma é uma representação esquemática, ou um diagrama, que permite observar o nível de similaridade por grupamentos formados (clusters). O nível de similaridade (ou distância) é medido ao longo do eixo vertical, em função das diferentes observações listadas ao longo do eixo horizontal (Minitab, 2023).

Figura 29 - Dendograma por distancia Euclidiana das propriedades (pH e espalhabilidade) das formulações. As cores indicam os grupos (clusters) que foram formados de acordo com o nível de similaridade.



Legenda: F_{base} : Formulação base; F_{OEM} : Formulação com OEM 3%; $F_{bioAgNP}$: Formulação com bioAgNP 3%; F_{OEO} : Formulação com OEO 2%; $F_{OEM;bioAgNP}$: Formulação com OEM 1,5% e bioAgNP 1,5%; $F_{OEO;bioAgNP}$: Formulação com bioAgNP 1,5% e OEO 1,0%; $F_{OEM;OEO}$: Formulação com OEO 1,0% e OEM 1,5%; $F_{OEM;bioAgNP;OEO}$: Formulação com OEM 1,0%, OEO 0,67%, bioAgNP 1,0%.

Foram formados 3 clusters principais (Figura 29): O primeiro com a formulação base (F_{base}) e a formulação com bioAgNP 3% ($F_{bioAgNP}$), o segundo com as formulações com OEM 3% e OEO 2% (F_{OEM} e F_{OEO}), e o terceiro com as demais formulações ($F_{OEM;bioAgNP}$, $F_{OEO;bioAgNP}$, $F_{OEM;OEO}$ e $F_{OEM;bioAgNP;OEO}$). De acordo com essa análise, é possível observar que a formulação $F_{bioAgNP}$ é a formulação mais próxima da F_{base} (cluster de cor preto), e que ambas se diferem das demais em relação aos parâmetros de pH e espalhabilidade. A provável hipótese de similaridade entre F_{base} e $F_{bioAgNP}$ seja para a característica hidrofílica das bioAgNP, tendo em vista que o sistema de emulsão é O/A. O segundo cluster formado foi o de cor amarelo, o qual indica a similaridade das formulações F_{OEM} e F_{OEO} , provavelmente pela similaridade

de compostos, ou seja, dois óleos essenciais. Por fim, o cluster em cor azul mostra a similaridade das formulações $F_{OEM;bioAgNP}$, $F_{OEO;bioAgNP}$, $F_{OEM;OEO}$ e $F_{OEM;bioAgNP;OEO}$, que são as formulações dos ativos em combinação.

5.4 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA ANTIFÚNGICA DAS FORMULAÇÕES

Para os testes de avaliação da eficácia antifúngica das formulações, todas as formulações testadas (F_{base} , F_{OEM} , $F_{bioAgNP}$, F_{OEO} , $F_{OEM;bioAgNP}$, $F_{OEO;bioAgNP}$ e $F_{OEM;OEO}$) foram manipuladas sem conservante, a fim de evitar a interferência da ação do conservante nos testes *in vitro*.

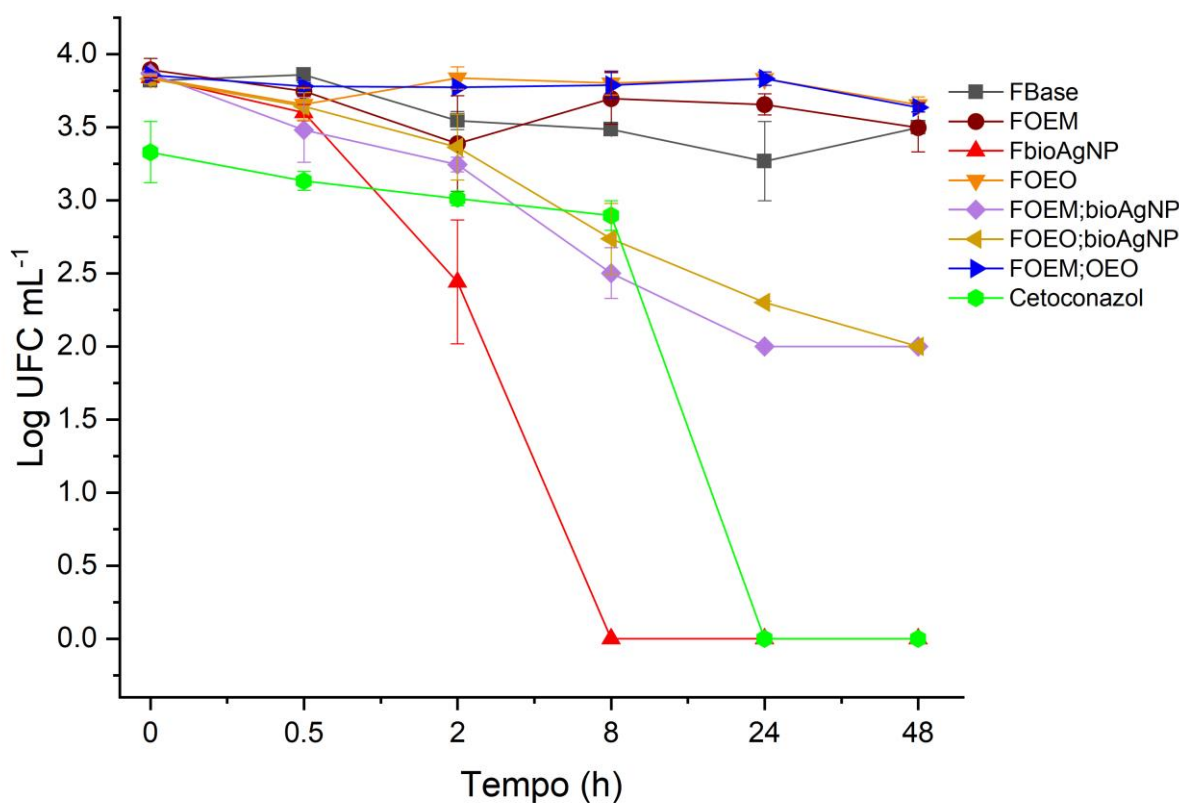
5.4.1 Curva de Sobrevivência

O ensaio da curva de sobrevivência, foi realizado para avaliar o efeito antifúngico de sete formulações desenvolvidas (F_{base} , F_{OEM} , $F_{bioAgNP}$, F_{OEO} , $F_{OEM;bioAgNP}$, $F_{OEO;bioAgNP}$ e $F_{OEM;OEO}$) e do Cetoconazol 20 mg/g (EMS S/A, Hortolândia/SP), contra a cepa de *M. pachydermatis*.

A curva de sobrevivência, foi realizada de acordo com Scandorireiro *et al.* (2023) com adaptações, em que as formulações desenvolvidas e o Cetoconazol entraram em contato com *M. pachydermatis* por 48 h. Foi realizada a recuperação das células fúngicas viáveis e subcultivo para quantificação nos tempos 0, 30 min, 2 h, 8 h, 24 h e 48 h. Os resultados do teste de curva de sobrevivência, estão descritos na Figura 30.

Não houve diferença significativa em termos de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) para a F_{base} , F_{OEO} , F_{OEM} pela ANOVA com posterior teste de Tukey ($p > 0.05$). Para $F_{OEM;OEO}$ ocorreu diferença significativa após 24 h, enquanto que para $F_{OEO;bioAgNP}$ ocorreu após 2 h, para o cetoconazol após 8 h e para $F_{bioAgNP}$ e $F_{OEM;bioAgNP}$, após 0.5 h ($p < 0.05$). De acordo com o ensaio de curva de sobrevivência, $F_{bioAgNP}$ 3% apresentou atividade antifúngica contra *M. pachydermatis*.

Figura 30 - Curva de sobrevivência da cepa *M. pachydermatis*, exposta às formulações desenvolvidas (F_{base}, F_{OEM}, F_{bioAgNP}, F_{OEO}, F_{OEM;bioAgNP}, F_{OEO;bioAgNP} e F_{OEM;OEO}) e ao cetoconazol comercial.



Legenda: F_{base}: Formulação base; F_{OEM}: Formulação com OEM 3%; F_{bioAgNP}: Formulação com bioAgNP 3%; F_{OEO}: Formulação com OEO 2%; F_{OEM;bioAgNP}: Formulação com OEM 1,5% e bioAgNP 1,5%; F_{OEO;bioAgNP}: Formulação com bioAgNP 1,5% e OEO 1,0%; F_{OEM;OEO}: Formulação com OEO 1,0% e OEM 1,5%; Cetoconazol 20 mg/g.

Na curva de sobrevivência (Figura 30), a formulação F_{bioAgNP} e o cetoconazol reduziram a população de *M. pachydermatis* em aproximadamente 4 log UFC/mL ($p < 0,05$) após aproximadamente 8 h e 24 h de tratamento, respectivamente. As colônias de *M. pachydermatis* sobreviveram ao tratamento com as formulações F_{OEO} e F_{OEM} ($p > 0,05$), assim como a F_{base} (formulação sem ativos antifúngicos) ($p > 0,05$), e não reduziram a população de *M. pachydermatis*. F_{OEM;OEO} apresentou diferença significativa em relação à sobrevivência leveduriforme após 24 h, porém ocorreu uma redução da população em aproximadamente 0,5 log UFC/mL ($p < 0,05$) em comparação com F_{OEO}, indicando também a viabilidades das células de *M. pachydermatis*. Para as formulações F_{OEM;bioAgNP} e F_{OEO;bioAgNP}, houve redução da população leveduriforme após 0,5 h e 2 h ($p < 0,05$) de tratamento, respectivamente.

No entanto, em 48 h a população de *M. pachydermatis* foi reduzida somente em aproximadamente 1,5 log ($p < 0,05$).

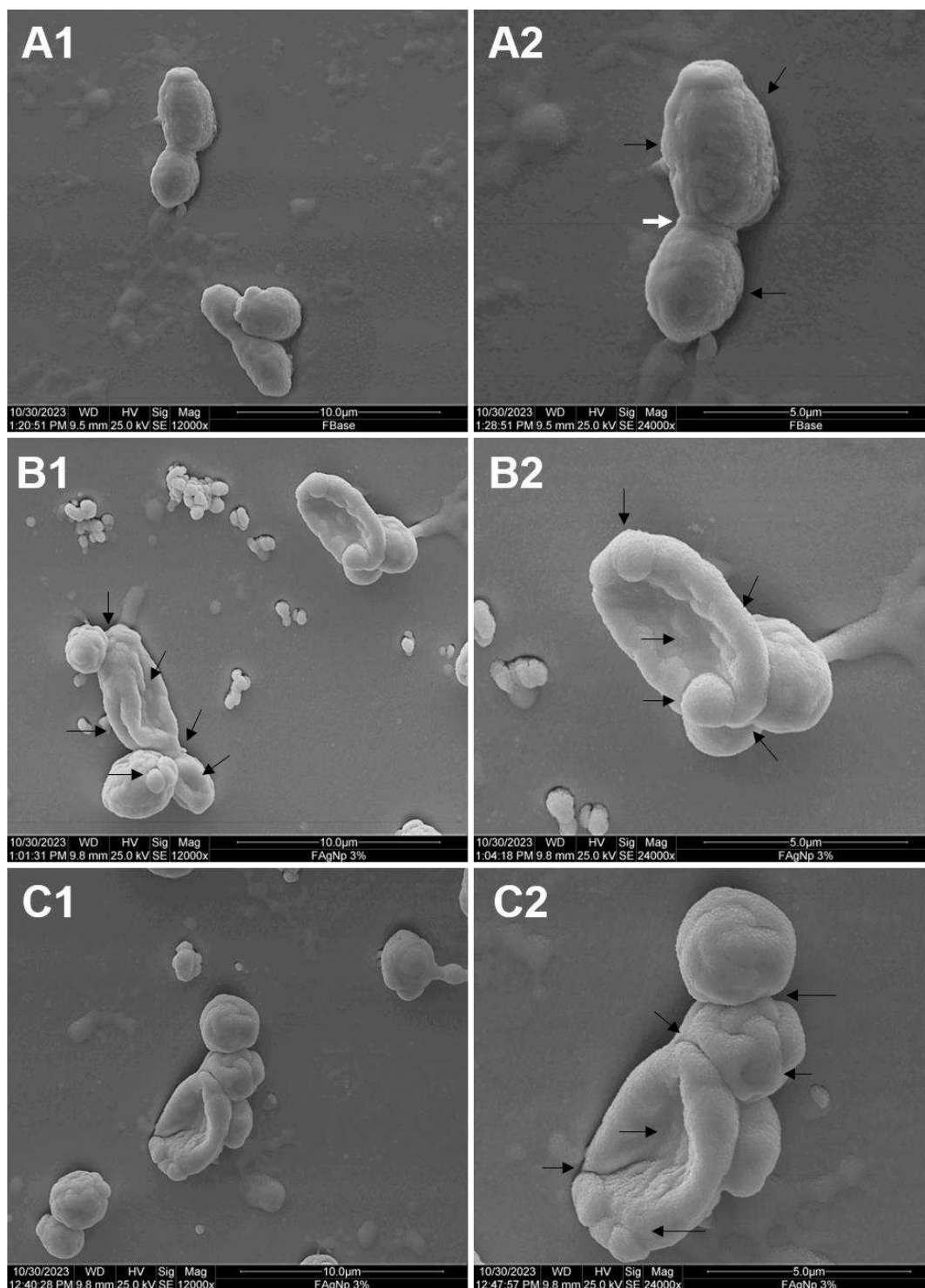
De acordo com os resultados obtidos de UFC/mL em relação ao tempo, a formulação F_{bioAgNP} 3% apresentou eficácia antifúngica contra *M. pachydermatis* ($p < 0,05$) assim como o cetoconazol 20mg/mL (controle). F_{bioAgNP} pode ser considerada como potencial alternativa terapêutica antifúngica no tratamento da Pitiríase versicolor. O caráter hidrofílico das bioAgNP e o sistema de emulsão O/A, possivelmente facilitaram com que as bioAgNP permeassem as células de *M. pachydermatis* com mais facilidade do que os óleos essenciais, e então, ocorresse a apoptose celular.

5.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Figura 31 (A1 a C2), está representada por micrografias eletrônicas de varredura do efeito das formulações F_{base} (controle) e F_{bioAgNP} 3% contra *M. pachydermatis*. A amostra leveduriforme tratada com F_{base}, mostrou tamanho típico e células em forma de blastoconídeos ovais (Figura 31 A2) com formação de colarete (seta branca). A imagem em maior ampliação (Figura 31 A2) mostra a superfície intacta de *M. pachydermatis*. As células tratadas com F_{bioAgNP} 3%, foram danificadas (saliências superficiais), sem tamanho típico de espécies leveduriformes (Figura 31 B1, B2, C1 e C2). As imagens em maior ampliação (Figura 31 B2 e C2), mostram detalhes de alterações morfológicas na superfície celular (setas pretas). As células tratadas com F_{bioAgNP} foram danificadas (saliências superficiais e cavidades).

A análise por MEV (Figura 31) mostrou que a formulação antifúngica desenvolvida (F_{bioAgNP} 3%) resultou em células altamente deformadas, causando danos físicos e alterações morfológicas consideráveis (bolhas superficiais e cavidades) em *M. pachydermatis*. As saliências superficiais indicam ruptura da parede celular e da membrana citoplasmática, fazendo com que ocorra o extravasamento do material citoplasmático (Scandorieiro *et al.*, 2022).

Figura 31 - Micrografias obtidas por MEV de *M. pachydermatis*. A1 e A2 são micrografias da morfologia leveduriforme tratada com F_{base}. B1, B2, C1 e C2 são morfologias leveduriformes tratadas com F_{bioAgNP 3%}.



Legenda: A1 e A2: Micrografias de *M. pachydermatis* em contato com F_{base} (controle) em aumento de 12.000 X e 24.000 X respectivamente; A2: Presença de blastoconídeos ovais (setas pretas) com colarete (seta branca); B1, B2, C1 e C2: Micrografias de *M. pachydermatis* em contato com F_{bioAgNP 3%}, em aumentos de 12.000 X (B1 C1) e 24.000 X (B2 e C2); B1, B2 e C2: Setas pretas indicam as deformações morfológicas observadas na membrana celular de *M. pachydermatis*, ocasionadas pelo tratamento de F_{bioAgNP 3%} contra *M. pachydermatis*.

As bioAgNP possuem muitos mecanismos de ação relacionados à sua ação antimicrobiana. O mecanismo mais provável de acontecer é pela ligação que as bioAgNP estabelecem com a superfície do microrganismo onde atuam, alterando a integridade da membrana. As deformações, encolhimento, agregação celular, formação de cavidade e poros, distorções na membrana, são os efeitos observados nas micrografias (Figuras 31 B1-C2). As bioAgNP também agem penetrando o no interior do microrganismo e interagem com seus componentes intracelulares, danificando as organelas e perdendo a função celular. As bioAgNP podem induzir reações de espécies reativas de oxigênio (EROs) e alteram os mecanismos de transdução de sinal vital para as células, levando a apoptose celular. Além disso, alterações nos componentes da estrutura celular podem ocorrer, como na queda das quantidades de ergosterol e quitina (Masimen *et al.*, 2022; Morandi, 2023).

Parâmetros como tamanho, morfologia, superfície e cristalinidade, estão diretamente relacionados às propriedades das NPs. Além desses parâmetros, o potencial de redução dos metais também influencia fortemente no potencial antimicrobiano das NPs, de modo que as moléculas doadoras de elétrons se ligam aos nanometais, interferindo na função celular do microrganismo (Scandorieiro, 2020).

Os EROs são produzidos em excesso quando as células se encontram em condições ambientais inviáveis. O estresse oxidativo, pode resultar em danos aos lipídios, proteínas e DNA celular. Podem se formar EROs como superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (OH^{\cdot}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), entre outros. Esses grupos se ligam a monômeros da membrana celular e quebram ligações glicosídicas, formando poros, participando da peroxidação lipídica. Além disso, interagem com o DNA acarretando em agregação ou interferindo na replicação do DNA, o que leva a disfunção mitocondrial, à inibição enzimática e danos ao DNA. Esse processo provoca a destruição da estrutura da membrana, e conseqüentemente, leva a morte do fungo (Mukherjee *et al.*, 2020; Gurunathan; Lee; Kim, 2022; Scandorieiro *et al.*, 2022; Slavin; Bach, 2022; Morandi, 2023).

Lushchak (2011) e Martínez *et al.* (2021) relatam que íons metálicos podem ser mais tóxicos para as células do que as próprias nanopartículas em si, tendo em vista seus tamanhos, facilitando a penetração na célula microbiana, além de formar complexos com biomoléculas celulares bem como proteínas, ácidos nucleicos e lipídios negativamente carregados.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os testes antimicrobianos evidenciaram o ótimo desempenho dos bioativos: OEO, OEM e bioAGNP, frente à inibição do crescimento do fungo *Malassezia pachydermatis* nos testes de disco difusão, de determinação de CIM e CFM e teste de interação entre os ativos em combinações binárias, que confirmam a sua eficiência fungicida.

Das oito formulações desenvolvidas, sete formulações foram estáveis, de acordo com os testes de estabilidade empregados e a formulação FOEM;bioAgNP;OEO foi reprovada, devido à instabilidade apresentada na coloração.

Todas as formulações apresentaram características organolépticas e físico-químicas adequadas, assim, como, pH compatível com o da pele (aproximadamente 5,0) e boa espalhabilidade.

Das formulações com ativos, F_{bioAgNP} apresentou a melhor espalhabilidade quando comparado a base, além de ser a única formulação a apresentar diferença significativa em termos de espalhabilidade pela ANOVA com posterior teste de Tukey ($p < 0.05$). Em relação ao parâmetro de pH e espalhabilidade, F_{bioAgNP} é a formulação mais próxima da F_{base}, evidenciado pela análise estatística dendograma por distância Euclidiana, e que ambas se diferem das demais.

Das sete formulações desenvolvidas com os bioativos, apenas F_{bioAgNP} 3% foi selecionada como potencial alternativa terapêutica antifúngica no tratamento da Pitíriase versicolor. F_{bioAgNP} 3% apresentou atividade antifúngica contra *M. pachydermatis* pelos testes de curva de sobrevivência e microscopia eletrônica de varredura (MEV). A avaliação da eficácia antifúngica de F_{bioAgNP} pela técnica de curva de sobrevivência, F_{bioAgNP} apresentou diferença estatística após 0.5 h ($p < 0.05$). Já o cetoconazol usado como controle do teste, apresentou diferença estatística após 8 h. Dessa forma, F_{bioAgNP} 3% mostrou ser eficaz contra *M. pachydermatis* assim como o cetoconazol 20 mg/g, tornando-a uma potencial alternativa para o tratamento da Pitíriase versicolor.

ANEXOS

ANEXO A

Declaração de Aceite de Capítulo de Livro



DECLARAÇÃO
de aceite

Declaramos que o manuscrito “Pitiríase versicolor: causas e novos ativos como potencial tratamento”, de autoria de Isabela Mazarim da Costa, Ana Julia Ribeiro Gaioto dos Santos, Thays Amélio Bergamini, Sara Scandorieiro, Nádia Azusa Urasaki, Leticia Yukari Nakao, Maria Gabriela Martins dos Reis, Diego Henrique Morandi, Noele Caroline Alves, Guilherme Fonseca Reis, Luciano Aparecido Panagio e Audrey Alesandra Stingham Garcia Lonni, foi aceite para publicação no e-book “Health and Medicine: Science, Care, and Discoveries” - ISBN nº 978-65-981429-6-4, editado pela Seven Publicações Ltda. CNPJ: 43.789.355/0001-14.

São José dos Pinhais, Brasil, 26 de Outubro de 2023.


Nathan Albano Valente
EDITOR DE REDAÇÃO

Seven Publicações Ltda. CNPJ: 43.789.355/0001-14 Tv. Fernando
Araújo Meira - Afonso Pena, São José dos Pinhais - PR, 83045-000

ANEXO B

Laudo Técnico do Óleo Essencial de Melaleuca



FERQUIMA

LAUDO TÉCNICO
 Óleo Essencial de Melaleuca (Tea Tree)
(Melaleuca alternifolia)

CAS Number: 68647-73-4

INCI: Melaleuca alternifolia Leaf Oil

Itens Controlados	Especificações
Aparência	Líquido Limpo
Cor	Incolor a amarelo palha
Impurezas	Isento
Odor	Característico
Densidade (20°C)	0,885 – 0,906
Índice de Refração (20°C)	1,470 – 1,482
Rotação Óptica	[+5° ; +15°]
Principais componentes (valores aproximados)	Terpineno-4-ol = 41% 1,8-cineol = 1% γ -terpineno = 21% α -terpineno = 9% α -terpineol = 4% Terpinoleno = 3% α -pineno = 3% p-cimeno = 3%
Obtenção	Destilação a vapor das folhas.
Origem	Austrália
Obs.: não contém OGM nem foi utilizado para teste em animais.	

Recomendações Especiais	
Manuseio	Uso de luvas, óculos de segurança sempre muito recomendável. Não ingerir. Evitar contato com a pele, olhos e mucosas. Se isso ocorrer, lavar imediatamente com água limpa em abundância. Em caso de deramamento, remover o material danificado com material abrasivo (areia, lama).
Risco	Produto inflamável a temperatura acima de 59°C. Pode provocar irritação ou alergia na pele.
Incêndio	Caso haja fogo, utilizar extintor de pó químico seco e água em forma de neblina, não utilizando jatos de água para não espalhar o produto. Usar equipamento de proteção individual.
Explosividade	Nenhum perigo em condições normais.
Uso	Este produto destina-se ao uso profissional / industrial e como é elaborado a partir de substâncias naturais pode apresentar pequenas variações de cor e cromatografia sem causar qualquer problema na performance do produto.
Armazenamento	Armazenar em local seco, longe de umidade e do calor, protegido da luz, em recipiente original bem vedado. Não reutilizar a embalagem vazia.
Transporte	Número de risco 30 / Número de ONU 1149 / Classe ou Subclasse de risco 3 / Descrição de classe ou subclasse: Líquidos inflamáveis / Grupo de Embalagem: III

As informações contidas nesta publicação representam o melhor de nosso conhecimento. Entretanto, nada aqui mencionado deve ser entendido como garantia de uso. Os consumidores devem efetuar seus próprios testes para determinar a viabilidade de aplicação.

Engenheira Química Responsável: Alice Lasthaus CRQ: IV/04330754

ANEXO C

Laudo Técnico do Óleo Essencial de Orégano


LAUDO TÉCNICO
 Óleo Essencial de Orégano
(Origanum vulgare)

CAS Number: 84012-24-8

INCI: Origanum vulgare Leaf Oil

Itens Controlados	Especificações
Aparência	Líquido Limpido
Cor	Amarelo claro esverdeado a marrom escuro
Impurezas	Isento
Odor	Característico, especiaria
Densidade (20°C)	0,935 – 0,970
Índice de Refração (20°C)	1,500 – 1,520
Rotação Ótica	[-5° ; +2°]
Principais componentes (valores aproximados)	Carvacrol= 72% Timol= 2% Gama-terpineno= 4,5% Para-cimeno= 4% Linalol= 4%
Obtenção	Destilação a vapor das folhas.
Origem	Moldávia
Obs.: não contem OGM nem foi utilizado para teste em animais.	

Recomendações Especiais	
Manuseio	Uso de luvas, óculos de segurança ampla visão recomendável. Não ingerir. Evitar contato com a pele, olhos e mucosa. Se isso ocorrer, lavar imediatamente com água limpa em abundância. Em caso de derramamento, absorver o material derramado com material absorvente (areia, terra).
Riscos	Pode provocar irritação ou alergia na pele.
Incêndio	Caso haja fogo, utilizar extintor de pó químico seco e água em forma de neblina, não utilizando jatos de água para não espalhar o produto. Usar equipamento de proteção individual.
Explosividade	Nenhum perigo em condições normais.
Uso	Este produto destina-se ao uso profissional / industrial e como é elaborado a partir de substâncias naturais pode apresentar pequenas variações de cor e cromatografia sem causar qualquer problema na performance do produto.
Armazenamento	Armazenar em local seco, longe de umidade e do calor, protegido da luz, em recipiente original bem vedado. Não reutilizar a embalagem vazia.
Transporte	Número de risco: 6.1 / Número da ONU: 2810 / Classe ou Subclasse de risco: 6.1 / Descrição da classe ou subclasse: Substâncias tóxicas / Grupo de Embalagem: III

As informações contidas nesta publicação representam o melhor de nosso conhecimento. Entretanto, nada aqui mencionado deve ser entendido como garantia de uso. Os consumidores devem efetuar seus próprios ensaios para determinar a viabilidade da aplicação.

Engenheira Química Responsável: Alice Lasthaus CRQ: IV 04330754

REFERÊNCIAS

- A.C. Camargo Cancer Center. **Dermatoscopia**. 2022. Disponível em: <<https://accamargo.org.br/sobre-o-cancer/medicina-diagnostica/dermatoscopia#:~:text=A%20dermatoscopia%20%C3%A9%20um%20%C3%A9todo,precisa%20de%20eventuais%20les%C3%B5es%20cut%C3%A2neas>>. Acesso em: 10 jan. 2024.
- ALBERDI, E.; GÓMEZ, C. Successful treatment of Pityriasis Versicolor by photodynamic therapy mediated by methylene blue. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**. v. 36, n. 4, p. 308–312, 2020.
- ALEXANDER, L. C. D. **Formulación de una nanoemulsion o/w elaborada a base de aceite esencial de *Origanum vulgare* como un tratamiento fitoterapéutico de aplicación tópica frente a cutibacterium acnes ATCC 11827**. 2020. 85 fls. Trabalho de conclusão de curso (Curso de Química Farmacêutica) - Universidad Central Del Ecuador, Quito. 2020.
- ALLEGUE, F.; FACHAL C.; GONZÁLEZ-VILLAS D.; ZULAICA A. Pitiriasis Versicolor atrófica. **Actas Dermosifiliográficas**. v. 109, p. 455-457, 2018.
- ALMEIDA, B. L. Modelo de pele humana reconstruída como plataforma para estudos de fotoenvelhecimento. 2020. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Amazonas. 2020.
- AMIRI, M. R.; ALAVI, M.; TARAN, M.; KAHRIZI, D. Antibacterial, antifungal, antiviral, and photocatalytic activities of TiO₂ nanoparticles, nanocomposites, and bio-nanocomposites: Recent advances and challenges. **Journal of Public Health Research**. v. 11, n. 2, p. 1-6, 2022.
- ANDRADE, A. R. C. de. **Banco de imagens ultraestruturais de espécies fúngicas de importância médica**. 2016. 77 fls. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2016.
- ANWAR, M. F.; YADAV, D.; JAIN, S.; KAPOOR, S.; RASTOGI, S.; ARORA, I.; SAMIM, M. Size- and shape-dependent clinical and mycological efficacy of silver nanoparticles on dandruff. **International Journal of Nanomedicine**. v. 11, p. 147-161, 2016.
- ARÁMBULA, C. I.; DIAZ, C. E.; GARCIA, M. I. Performance, chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Ruta chalepensis* and *Origanum vulgare*. **Journal of Physics: Conference Series**. v. 1386, 2019.
- ARAÚJO, L. O. de. **Embalagens ativas: Síntese de filmes antimicrobianos à base de Polietileno de baixa densidade e zeólita A contendo prata**. 2019. 60 fls. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal. 2019.
- ARYAL, S. **Mode of action of antifungals drugs**. Microbiology Info.com. 2022. Disponível em: <<https://microbiologyinfo.com/mode-action-antifungal-drugs/>> Acesso em: 01 nov. 2023.

ASSIS, K. M. A. de; RÊGO, R. I. de A.; MELO, D. F. de; SILVA, L. M. da; OSHIRO-JÚNIOR, J. A.; FORMIGA, F. R.; PIRES, V. C.; LIMA, A. A. N. de; CONVERTI, A.; DAMASCENO, B. P. G. de L. Therapeutic potencial of *Melaleuca alternifolia* essential oil in new drug delivery systems. **Current Pharmaceutical Design**. v. 26, p. 4048-4055, 2020.

BARRADAS, T. N.; SILVA, K. G. H. Nanoemulsions of essential oils to improve solubility, stability and permeability: a review. **Environmental Chemistry Letters**. v. 19, p. 1153 – 1171, 2021.

BATTISTI, M. A.; CAON, T.; CAMPOS, A. M. de. A short review on the antimicrobial micro- and nanoparticles loaded with *Melaleuca alternifolia* essential oil. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**. 2020.

BELLIO, P.; FAGNANI, L.; NAZZICONE, L.; CELENZA, G. New and simplified method for drug combination studies by checkerboard assay. **MethodsX**. v. 8, 2021.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*. v. 235, p. 337-351, 2016.

BHATTACHARYA, D.; SAHA, R.; MUKHOPADHYAY, M. Combination therapy using metal nanoparticles for skin infections. In: *Nanotechnology in Skin, Soft Tissue, and Bone Infections*. 1 ed. **Suiça: Springer International Publishing**, v.1, p. 49-69, 2020.

BISMARCK, D.; DUSOLD, A.; HEUSINGER, A.; MÜLLER, E. Antifungal in vitro activity of essential oils against clinical isolates of *Malassezia pachydermatis* from canine ears: A report from a practice laboratory. **Complementary Medicine Research**. v. 27, n. 3, p. 143-154, 2019.

BOCATE, K. P.; REIS, G. F.; SOUZA, P. C.; OLIVEIRA JUNIOR, A. G.; DURÁN, N.; NAKAZATO, G. Antifungal activity of silver nanoparticles and simvastatin against toxigenic species of *Aspergillus*. **International Journal of Food Microbiology**. v. 291, p. 79-86, 2019.

BORA, L.; AVRAM, S.; PAVEL, I. Z.; MUNTEAN, D.; LIGA, S.; BUDA, V.; GURGUS, D.; DANCIU, C. An Up-To-Date review regarding cutaneous benefits of *Origanum vulgare* L. essential oil. **Antibiotics**. v. 11, 2022.

BOUYAHYA, A.; ABRINI, J.; DAKKA, N.; AND BAKRI, Y. Essential oils of *Origanum compactum* increase membrane permeability, disturb cell membrane integrity, and suppress quorum-sensing phenotype in bacteria. **Journal of Pharmaceutical Analysis**. v. 9, p. 301–311, 2019.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. 1. ed., 2004, 1, 52.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos**. 2008.

BRUN, P.; BERNABÈ, G.; FILIPPINI, R.; PIOVAN, A. In Vitro Antimicrobial Activities of Commercially Available Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) Essential Oils. **Current Microbiology**. v.76, p. 108-116, 2019.

CADINOIU, A.N.; RATA, D. M.; DARABA, O. M.; ICHIM, D. L.; POPESCU, I.; SOLCAN, C.; SOLCAN, G. Silver Nanoparticles Biocomposite Films with Antimicrobial Activity: In Vitro and In Vivo Tests. **International Journal of Molecular Sciences**. 2022.

CARSON, C. F.; HAMMER, K. A.; RILEY, T. V. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. v. 19, n. 1, p. 50-62, 2006.

CARVALHO, K. B. D.; OLIVEIRA, M. de A. N.; CAVALCANTI, D. da S. P. As propriedades do óleo essencial de *Origanum vulgare* e seus benefícios terapêuticos. **Saúde & Ciência em Ação**. v. 7, n. 1, 2021.

CETOCONAZOL: Cetoconazol [Bula do medicamento na internet]. Responsável Técnico Rodrigo Molinari Elias. Anápolis–GO: Brainfarma Indústria Química e Farmacêutica S.A.; 2018. Disponível em: <https://img.drogasil.com.br/raiadrogasil_bula/Cetoconazol200mgNeoQuimica.pdf> Acesso em: 20 out. 2023.

CHAMBERS, E. S.; VUKMANOVIC-STEJIC, M. Skin barrier immunity and ageing. **Immunology**. v. 160, p. 116-125, 2019.

CHEBIL, W.; HAOUAS, N.; CHAÂBANE-BANAOUES, R.; REMADI, L.; CHARGUI, N.; M`RAD, S.; BELGACEM, S.; SALAH, A. B.; ALI, H. B.; CHEMLI, Z.; LAKOUDI, M.; CAFARCHIA, C.; BABBA H. Epidemiology of Pityriasis versicolor in Tunisia: Clinical features and characterization of *Malassezia* species. **Journal of Medical Mycology**. v.32, 2022.

CHUE GONÇALVES, Marcelly. **Atividade Antimicrobiana e Antiviral de Nanopartículas de Prata Biogênicas e Violaceína**. 2022. 81 p. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

CID-CHEVECICH, C.; MÜLLER-SEPÚLVEDA, A.; JARA, J. A.; LÓPEZ-MUÑOZ, R.; SANTANDER, R.; BUDINI, M.; ESCOBAR, A.; QUIJADA, R.; CRIOLLO, A.; DÍAZ-DOSQUE, M.; MOLINA-BERRÍOS, A. *Origanum vulgare* L. essential oil inhibits virulence patterns of *Candida* ssp. and potentiates the effects of fluconazole and nystatin in vitro. **BMC Complementary Medicine and Therapies**. v.22, n. 39, 2022.

CIOL, H.; CASTRO, C. A. de. Anatomia e funções da pele. In: AQUINO JUNIOR, A. E. de et al. **Feridas: um desafio para a saúde pública**. São Carlos: Do Autor, 2019. Cap. 2, p. 17-24.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Método de referência para testes de suscetibilidade antifúngica de leveduras por diluição em caldo**. Documento M27. Wayne, PA. 2017.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Método para teste de suscetibilidade antifúngica à difusão em disco de leveduras; Norma aprovada**. Documento M44-A. Wayne, PA. 2004.

COMUNIDADE SANAR. **Pitiríase versicolor: Estratégias para o diagnóstico e tratamentos**. 2021. Disponível em: <<https://www.sanarmed.com/pitirias-versicolor-estrategias-para-o-diagnostico-e-tratamento-colunistas>> Acesso em: 10 jan. 2024.

CORDEIRO, S. Z. *Origanum vulgare* L.. 2020. Disponível em: <<https://www.unirio.br/ccbs/ibio/herbariohuni/origanum-vulgare-l>> Acesso em: 11 jan. 2024.

CRUZ-LUNA, A. R.; CRUZ-MARTÍNEZ, H.; VÁSQUEZ-LÓPEZ, A.; MEDINA, D. I. Metal nanoparticles as novel antifungal agents for sustainable agriculture: Current advances and future directions. *Journal of Fungi*. v. 7, 1033, 2021.

DAHMER, D. **Desenvolvimento de hidratante labial multifuncional contendo levana de *Bacillus subtilis natto* e soforolipídios de *Starmerella bombicola* com propriedades hidratante, antioxidante e antimicrobiana.** 2023. 140 fls. Dissertação (Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2023.

DEBIAGI, F.; KOBAYASHI, R. K. T.; NAKAZATO, G.; PANAGIO, L. A.; MALI, S. Antimicrobial activity of oregan and clove essential oils against some foodborne pathogens. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina**. v. 41, n. 1, p. 3-12, 2020.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach.** 2. ed. Nottingham, Uk: John Wiley & Sons, Ltd, 2002.

DURÁN, N; MARCATO, P. D; ALVES, O. L; SOUZA, G. H; ESPOSITO, E. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. **Journal of Nanobiotechnology**. v.3, n.8, p. 1-7. Jul 2005.

EBANI, V. V.; BERTELLONI, F.; NAJAR, B.; NARDONI, S.; PISTELLI, L.; MANCIANTI, F. Antimicrobial activity of essential oils against *Staphylococcus* and *Malassezia* strains isolated from Canine Dermatitis. **Microorganisms**. v. 8, n. 2, 2020.

ELAMAWI, R. M., AL-HARBI, R. E., AND HENDI, A. A. Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Trichoderma longibrachiatum* and their effect on phytopathogenic fungi. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**. v. 28, n. 28, 2018.

ESPINEL-INGROFF, A.; FOTHERGILL, A.; PETER, J.; RINALDI, M. G.; WALSH, T. J. Testing conditions for determination of minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for *Aspergillus* spp.: NCCLS collaborative study. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40, n. 9, p. 3204-3208, 2002.

FARIÑA-GONZÁLEZ, N.; ACOSTA, R.; SAMUDIO M.; ALDAMA, A.; BOLLA, L.; FIGUEIREDO, L.; GIUSIANO, G. Especies de *Malassezia* causantes de pitiriasis versicolor en Paraguay. **Revista Chilena Infectol**. v. 36, n. 6, p. 742-749, 2019.

FERQUIMA, **Indústria e comércio de óleos essenciais.** 2023. Disponível em: <https://www.ferquima.com.br/novo/index_novo.html> Acesso em: 20 set. 2023.

FERQUIMA, Indústria e comércio de óleos essenciais. 2023. **Laudo técnico: Óleo Essencial de Melaleuca (Tea Tree) (*Melaleuca alternifolia*).** Disponível em: <<https://www.ferquima.com.br/novo/produtos/pdf/MELALEUCA%20OE.pdf>> Acesso em: 20 set. 2023.

FERQUIMA, Indústria e comércio de óleos essenciais. 2023. **Laudo técnico: Óleo Essencial de Orégano (*Origanum vulgare*)**. Disponível em: <<https://www.ferquima.com.br/novo/produtos/pdf/OREGANO%20OE.pdf>> Acesso em: 20 set. 2023.

FIGUEREDO, L. A.; CAFARCHIA, C.; OTRANTO, D. Antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* biofilm. **Medical Mycology**. v. 51, p. 863-867, 2013.

FLOWERS, L.; GRICE, E. A. The skin microbiota: balancing risk and reward. **Cell Host Microbe**. v. 28, n.2, p. 190-200, 2020.

FONSECA, M. S.; RODRIGUES, D. M.; SOKOLONSKI, A. R.; STANISIC, D.; TOMÉ, L. M.; GÓES-NETO, A.; AZEVEDO, V.; MEYER, R.; ARAÚJO, D. B.; TASIC, L.; PORTELA, R. D. et al. Activity of *Fusarium oxysporum*-Based Silver Nanoparticles on *Candida* spp. Oral Isolates. **Nanomaterials**. v. 12, n. 3, p. 501, 2022.

GARCIA, D. G.; SANTOS, K. O.; FREITAS, K. F. D.; CARDOSO, M. J. B.; FOOK, M. V. L. Síntese de nanopartículas de prata pela técnica de eletrodeposição para desenvolvimento de biossensores. **Brazilian Journal of Development**. v. 7, n. 3, p. 31130-31145, 2021.

GHAREHBOLAGH, S. A.; MAHMOUDI, S.; ASGARI, Y.; RAHIMI, H.; AFSHARI, S. A. K.; NOORBAKHSH, F.; REZAIE, S. Trioredoxin is a potencial pathogenesis attribute of *Malassezia globosa* and *Malassezia sympodialis* in pityriasis versicolor. **Gene Reports**, v. 17, 100468, 2019.

GRICE, E. A.; DAWSON, T. L. Host- microbe interactions: *Malassezia* and human skin. **Current Option in Microbiology**. v. 40, p.81-87, 2017.

GUILGER-CASAGRANDE, M.; LIMA, R. de. Synthesis of silver nanoparticles mediated by fungi: A review. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**. v. 7, 287, 2019.

GUPTA, A. K.; FOLEY, K. A. Antifungal treatment for pityriasis versicolor. **Journal of Fungi**, v. 1, p. 13-29, 2015.

GUPTA, A. K.; LYONS, D. C. A. Pityriasis versicolor: an update on pharmacological treatment options. **Expert Opin Pharmacother**. v. 15 n. 12, p. 1707-13, 2014.

GURUNATHAN, S.; LEE, A. R.; KIM, J. H. Antifungal effect of nanoparticles against COVID-19 linked black fungus: A perspective on biomedical applications. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 23, 12526, 2022.

HUDSON, A.; STURGEON, A.; PEIRIS, A. Tinea Versicolor. **Jama Patient Page**, v.320, n.13, 2018.

ISLAM, M. A.; JACOB, M. V.; ANTUNES, E. A critical review on silver nanoparticles: From synthesis and applications to its mitigation through low-cost adsorption by biochar. **Journal of Environmental Management**. v. 281, 111918, 2021.

IVANOV, M.; ĆIRIĆ, A.; STOJKOVIĆ, D. Emerging Antifungal Targets and Strategies. **International Journal Molecular Sciences**. v. 23, 2756, 2022.

JAMKHANDE, P. G.; GHULE, N. W.; BAMER, A. H.; KALASKAR, M. G. Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation advantages and disadvantages, and applications. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**. v. 53, 101174, 2019.

JENJOB, R.; PHAKKEERE, T.; SEIDI, F.; THEERASILP, M. Emulsion techniques for the production of pharmacological nanoparticles. **Macromolecular Bioscience**. v. 19, n. 6, 2019.

JO, J.; KENNEDY, E. A.; KONG H. H. Topographical and physiological differences of the skin mycobiome in health and disease. **Virulence**. v. 8, n. 3, p. 324-333, 2017.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**. v. 10, p. 813-829, 2003

KARRAY, M.; MCKINNEY, W. P. Tinea Versicolor. **NCBI Bookshelf**. 2022

KHANDEL, P.; SHAHI, S. K. Mycogenic nanoparticles and their bio-prospective applications: current status and future challenges. **Journal of Nanostructure in Chemistry**. v. 8, p. 369-391, 2018.

KHATTAB, F. M.; OMRAN, F. H. 308-nm excimer laser: a hopeful and optional therapy for Pityriasis Versicolor. **Journal of Dermatological Treatment**. p. 1471-1753, 2020.

KRISHNASAMY, L.; KRISHNAKUMAR, S.; KUMARAMANICKAVEL, G.; SAIKUMAR, C. Molecular mechanisms of antifungal drug resistance in *Candida* species. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**. v. 12, n. 9, DE01-DE06, 2018.

KRUEGER, L.; SAIZAN, A.; STEIN, J. A.; ELBULUK, N. Dermoscopy of acquired pigmentary disorders: a comprehensive review. **International Journal of Dermatology**. v. 61, n. 1, p. 7-19, 2021.

KRYEZIU, T. L.; HÁ LOCIO, E.; LOSHAJ-SHALA, A.; BAGGI, U.; ORAL, A.; STEFKOV, G. J.; ZIMMER, A.; BASHOLLI-SALIHU M. Nanoencapsulation of *Origanum vulgare* essential oil into liposomes with anticancer potential. **Pharmazie**. v. 77, n. 6, p. 172-178, 2022.

KUMAR, A; PRASAD, K. S. Role of nano-selenium in health and environment. **Journal of Biotechnology**. v.325, p. 152-163. Jan 2021.

KUMAR, S. A.; ABYANEH, M. K.; GOSAVI, S. W.; KULKARNI, S. K.; PASRICHA, R.; AHMAD, A.; KHAN, M. I. Nitrate reductase-mediated synthesis of silver nanoparticles from AgNO₃. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 3, p. 439–445, 2007.

LEAL, G. C.; COSTA, I. M. da; SILVA, J. B. da; SANTOS, R. S. dos; BRUSCHI, M.L.; MELLO, J. C. P.; NAKAMURA, C. V.; LONNI, A. A. S. G. Development, characterization, and evaluation by cutaneous bioengineering of a natural emulsion, to provide a standardized vehicle base for tropical compounded preparations. **Research, Society and Development**. v. 11, n.16, 2022.

LEE, H.; KIM, M. Skin barrier function and the microbiome. **Molecular Sciences**. v. 23, 2022.

LEE, S. H.; JUN, Bong-Hyun. Silver nanoparticles: Synthesis and application for nanomedicine. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 20, n. 4, 865, 219.

LESSA, J. B. de A. **Avaliação in vitro e in silico de derivados de tioureias contendo piperazina com potencial atividade antifúngica**. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) – Instituto de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Macaé, 2022.

LI, Q.; LIU, F.; LI, M.; CHEN, C.; GADD, G. M. Nanoparticle and nanomineral production by fungi. **Fungal Biology Reviews**. v.41, p. 31-44, 2022.

LIMA, E. de O.; BELÉM, L. F.; CECHINEL FILHO, V.; CORRÊA, R.; NUNES, R. J.; ADRICOPULO, A.; SILVA, V. E. da. Avaliação da sensibilidade de cepas de *Malassezia furfur* a imidas cíclicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.38, n.4, p.443-450, 2002.

LONNI, A. A. S. G.; MUNHOZ, V. M.; LOPES, G. C.; LONGHINI, R.; PANGONI, F. B. B.; SANTOS, R. S.; JUNQUEIRA, M. V.; NATALI, M. R. M.; LEITE-MELLO, E. V. S.; GUIMARAES, F. B.; BAESSO, M. L.; SCARMINIO, I. S.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P. Development and characterization of multiple emulsions for controlled release of *Trichilia catigua* (Catuaba) extract. **Pharmaceutical Development and Technology**. p.1 - 10, 2015.

LUSHCHAK, V. I. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**. v.153. p. 175-190. 2011.

MACEDO, P. M. de; FREITAS, D. FS. Superficial infections of the skin and nails. **Encyclopedia of Mycology**. v. 1, p. 707-718, 2020.

MARTÍNEZ, A; APIP, C; MELÉNDREZ, M. F; DOMINGUEZ, M; SANHUEZA, S; MARZIALETTI, T; CATALAN, A. Dual antifungal activity against *Candida albicans* of copper metallic nanostructures and hierarchical copper oxide marigold-like nanostructures grown in situ in the culture médium. **Journal of Applied Microbiology**. v.130, n.6, p. 1883-1892, 2021.

MASIMEN, M. A. A.; HARUN, N. A.; MAULIDIANI, M.; ISMAIL, W. I. W. Overcoming Methicillin-Resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) Using Antimicrobial Peptides-Silver Nanoparticles. **Antibiotics**. 2022.

MAURYA, A.; PRASAD, J.; DAS, S.; DWIVEDY, A. K. Essential oils and their application in food safety. **Frontiers in Sustainable Food Systems**. v. 5, 653420, 2021.

MENDES, J. E.; CAMARGO, E. R.; SOUSA, C. P.; PESSOA, J. D. C. Caracterização de nanopartículas de prata pela técnica de espelhamento de luz dinâmico (DLS). VII Workshop de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio. 2014. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/115371/1/arq-62.pdf>> Acesso em: 13 nov. 2023.

MINITAB, 2023. **Dendrograma**. Minitab Statistical Software, 2023. Disponível em: <<https://support.minitab.com/pt-br/minitab/21/help-and-how-to/statistical->

[modeling/multivariate/how-to/cluster-observations/interpret-the-results/all-statistics-and-graphs/dendrogram/#:~:text=O%20dendrograma%20%C3%A9%20um%20diagrama,em%20seus%20n%C3%ADveis%20de%20similaridade>](#) Acesso em: 13 set. 2023.

MORANDI, D. H. **Síntese, caracterização e atividade antifúngica de nanopartículas metálicas e sinvastatina contra fungos causadores de infecções superficiais**. 2023. 104 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

MUKHERJEE, K; ACHARYA, K; BISWAS, A; JANA, N. R. TiO₂ Nanoparticles Co-doped with Nitrogen and Fluorine as Visible- Light-Activated Antifungal Agents. **Applied Nano Materials**. v.3, 2016-2025. Jan 2020.

MÜLLER, C. R.; GUTERRES, S. S. Caracterização e avaliação da estabilidade física de emulsões contendo filtros solares. **Revista Brasileira de Farmácia**, São Paulo, n. 80 (1/2), p. 12-17, 1999.

MURDAN, S.; MILCOVICH, G.; GORIPARTHI, G. S. An Assessment of the Human Nail Plate pH. **Skin Pharmacology and Physiology**. v. 24, n. 4, p.175–181, 2011.

NAGANTHRAN, A.; VERASOUNDARAPANDIAN, G.; KHALID, F. E.; MASARUDIN, M. J.; ZULKHARNAIN, A.; NAWAWI, N. M.; AHMAD, S. A. Synthesis, Characterization and Biomedical Application of Silver Nanoparticles. **Materials**, 15(2), 427, 2022.

NAKAZATO, G.; LONNI, A. A. S. G.; PANAGIO, L. A.; DE CAMARGO, L. C.; GONÇALVES, M. C.; REIS, G. F.; MIRANDA-SAPLA, M. M.; TOMIOTTOPELLISSIER, F.; KOBAYASHI, R. K. T. Applications of Nanometals in Cutaneous Infections In: Nanotechnology in Skin, Soft Tissue, and Bone Infections. **1 ed. Suíça: Springer International Publishing**, v.1, p.71-92, 2020.

NAQUVI, K. J.; AHAMAD, J.; NAJMI, A. K. A critical review on traditional uses, phytochemistry and pharmacological uses of *Origanum vulgare* linn. **International Research Journal of Pharmacy**. v. 10, n. 3, p. 7-11, 2019.

NETO, B. de B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2. Ed, Campinas-SP: Editora da Unicamp, 2001.

NETTO, C. G. Tese investiga mecanismo de controle de formas e tamanhos de nanopartículas de metais nobres. **Jornal da UNICAMP**, 26 de maio a 01 de junho de 2008. Disponível em: <https://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/jornalPDF/ju396pag02.pdf> Acesso em: 11 jan. 2024.

NOAH, N. Green synthesis: Characterization and application of silver and gold nanoparticles. In: SHUKLA; Ashutosh Kumar; IRAVANI, Siavash. **Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles**: A volume in Micro and Nano Technologies. 1ª Edição. Cambridge: Elsevier, 2018. p. 111-135.

OKSANEN, J.; SIMPSON, G. L.; BLANCHET, F. G.; KINDT, R.; LEGENDRE, P.; MINCHIN, P. R.; O'HARA, R. B.; SOLYMOS, P.; STEVENS, M. H. H.; SZOECs, E.;

WAGNER, H.; BARBOUR, M.; BEDWARD, M.; BOLKER, B.; BORCARD, D.; CARVALHO, G.; CHIRICO, M.; DE CACERES, M.; DURAND, S.; EVANGELISTA, H. B. A.; FITZJOHN, R.; FRIENDLY, M.; FURNEAUX, B.; HANNIGAN, G.; HILL, O. M.; LAHTI, L.; MCGLINN, D.; OUELLETTE, Marie-Helene; CUNHA, E. R.; SMITH, T.; STIER, A.; TER BRAAK, C. J. F.; WEEDON, J. (2022). **vegan: Community Ecology Package**. R package version 2.6-2. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>

OLIVEIRA SANTOS, G. C. de; VASCONCELOS, C. C.; LOPES, A. J. O.; , SOUSA CARTÁGENES, M. do S. de; FILHO, A. D. B.; NASCIMENTO, F. R. F. do; RAMOS, R. M.; PIRES, E. R. R. B.; ANDRADE, M. S. de; ROCHA, F. M. G.; MONTEIRO, C. de A. Candida infections and therapeutic strategies: Mechanisms of action for traditional and alternative agentes. **Frontiers in Microbiology**. v. 9, 1351, 2018.

OLIVEIRA, S. da S. **Fungitoxicidade de óleos essenciais sobre *Colletotrichum theobromicola*, causador da antracnose de cebolinha (*Allium fistulosum*)**. 2019. 68 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura no Trópico Úmido) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus-AM, 2019.

OLIVEIRA, T. G. de S. **Biossíntese de nanopartículas de prata com própolis verde e sua atividade antifúngica**. 2023. 62 f. Dissertação (mestrado) – Departamento de Química (Pós-Graduação em Inovação Tecnológica da Universidade de Minas Gerais), Belo Horizonte-MG, 2023.

OLIVEIRA, V. M. L. de; PIMENTEL, K. G. B.; SILVA, J. O. da; CUNHA, A. C. da; GUIMARÃES, N. E. de S.; FERNANDES, F. H. A. Aplicação do método checkerboard para avaliação de sinergismo antibacteriano em óleos essenciais: Uma revisão. *Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management*. v. 17, n. 4, p. 881 - 907, 2021.

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

PRABHU, S.; POULOSE, E. Silver Nanoparticles: Mechanism of Antimicrobial Action, Synthesis, Medical Applications, and Toxicity Effects. **International Nano Letters**. v. 2, n. 32, 2012.

R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

RAZAK, N. H. A.; MALEK, N. A. N. N.; MATMIN, J.; DAGANG, W. R. Z. W.; ZAWAWI, N. A.; CHUNDAWAT, T. S. Brief Review on Bioresources Green Synthesis of Silver Nanoparticles. **Journal of Advanced Research in Materials Science**. v.79, n.1, p. 1-10, 2021.

REIS, G. F. **Produção, caracterização e atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata biogênicas sintetizadas por *Lichtheimia ornata***. 2019. 71 fls. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil, 2019.

RENATI, S.; CUKRAS, A.; BIGBY, M. **Pityriasis versicolor**. 2015.

ROANA, J.; MANDRAS, N.; SCALAS, D.; CAMPAGNA, P.; TULLIO, V. Antifungal activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil (TTO) and its synergy with Itraconazole ou Ketoconazole against *Trichophyton rubrum*. **Molecules**. v. 26, n. 2, 2021.

RODOPLU, G.; SARACLI, M. A.; GÜMRAL R.; YILDIRAN, S. T. Distribution of *Malassezia* species in patients with pityriasis versicolor in Turkey. **Journal de Mycologie Médicale**. v. 24, n. 2, p. 117-123, 2014.

ROMERO-SANDOVAL, K.; COSTA, A. A.; SOUSA, M. G. T.; FURUCHO, C. R.; VALENTE, N.; CRIADO, P. R.; AOKI V.; BENARD, G. Recurrent and disseminated pityriasis versicolor: a novel clinical form consequent to *Malassezia*-host interaction? **Medical Hypotheses**. 2017.

ROY, A.; BULUT, O.; SOME, S.; MANDAL, A. K.; YILMAZ, M. D. Green synthesis of silver nanoparticles: biomolecule-nanoparticle organizations targeting antimicrobial activity. **Royal Society of Chemistry**. v.9, p. 2673-2702, 2019.

SAFADY, N. G. Metagenômica: novo estudo global de microbioma urbano. 2021. Disponível em: <<https://blog.varsomics.com/metagenomica-urbana/>> Acesso em: 20 set. 2023.

SANTANA, J. O.; AZEVEDO, F. L. A. de; CAMPOS FILHO, P. C. Pityriasis versicolor: clinical-epidemiological characterization of patients in the urban area of Buerarema-BA, Brazil. **An Bras Dermatol**. v. 88, n. 2, p. 216-21, 2013.

SANTIN, R.; GIORDANI, C.; MADRID, I. M.; MATOS, C. B.; FREITAG, R. A.; MEIRELES, M. C. A.; CLEFF, M. B.; MELLO, J. R. B. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare* frente a *Malassezia pachydermatis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 66, n. 2, p. 367-373, 2014.

SANTOS, A. L. dos; ARAUJO, M. S. R.; SOUZA, R. D. de; OLIVEIRA, W. C. de L. Óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* no tratamento da acne. **Research, Society and Development**. v. 10, n. 15, 2021.

SAUNTE, D. M.; GAITANIS, G.; HAY, R. J. *Malassezia*-associated skin diseases, the use of diagnostics and treatment. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v. 10, 2020.

SAWANT, A.; KAMATH, S.; KG, H.; KULYADI, G. P. Solid-in-oil-water emulsion: an innovative paradigm to improve drug stability and biological activity. **AAPS PharmSciTech**. v. 22, 199, 2021.

SCANDORIEIRO, S. **Combinação de nanopartículas de prata biogênicas e derivados do *Origanum vulgare* (Orégano) no combate a bactérias multirresistentes e produtoras de biofilme**. 2020. 309 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

SCANDORIEIRO, S.; KIMURA, A. H.; CAMARGO, L. C.de; GOLÇALVES, M. C.; SILVA, J. V. H. da; RISSO, W. E.; ANDRADE, F. G. de; ZAIA, C. T. B. V.; LONNI, A. A. S. G.; dos REIS MARTINEZ, C. B.; DURÁN. N.; NAKAZATO, G.; KOBAYASHI, R. K. T. Hydrogel-Containing Biogenic Silver Nanoparticles: Antibacterial Action,

Evaluation of Wound Healing, and Bioaccumulation in Wistar Rats. **Microorganisms**. v. 11, n. 1815, 2023.

SCANDORIEIRO, S.; RODRIGUES, B. C. D.; NISHIO, E. K.; PANAGIO, L. A.; OLIVEIRA, A. G. de; DURÁN, N.; NAKAZATO, G.; KOBAYASHI, R. K. T. Biogenic silver nanoparticles strategically combined with *Origanum vulgare* derivatives: antibacterial mechanism of action and effect on multidrug-resistant strains. **Frontiers in Microbiology**. v. 13, 2022.

SHAFIEI, M.; PEYTONB, L.; HASHEMZADEHC, M.; FOROUMADI, A. History of the development of antifungal azoles: A review on structures, SAR, and mechanism of action. **Bioorganic Chemistry**. v. 104, 104240, 2020.

SHNOUDEH, A. J.; HAMAD, I.; ABDO, R. W.; QADUMII, L.; JABER, A. Y.; SURCHI, H. S.; ALKELANY, S. Z. Synthesis, Characterization, and Applications of Metal Nanoparticles. In: TEKADE, Ralesh K. **Biomaterials and Bionanotechnology**. 1ª Edição. Academic Press, p. 528-585, 2019.

SIGMA ALDRICH. Tabela e lista de espectro IV. 2023. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/photometry-and-reflectometry/ir-spectrum-table>> Acesso em: 20 dez. 2023.

SILVIA, V. C. da. **Síntese biogênica de nanopartículas de prata por fungos marinhos: Seleção, otimização, caracterização, atividade antimicrobiana e potencial toxicidade em organismo aquático**. 2019. 57 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho", São Vicente - SP, 2019.

SIVIERI, K.; CODES CRESPO, C. de; NOVAK, J; TOBARA, J. C.; MARTINS, W. K. Microbiota da pele: novos desafios. **Arquivos Catarinenses de Medicina**. v. 50, n. 1, p. 93-112, 2021.

SLAVIN, Y. N; BACH, H. Mechanisms of Antifungal Properties of Metal Nanoparticles. **Nanomaterials**. v.12, n.4470. p. 1-35. Dez 2022.

SOUZA, E. L.; OLIVEIRA, C. E. V.; STAMFORD, T. L. M.; CONCEIÇÃO, M. L.; GOMES NETO, N. J. Influence of carvacrol and thymol on the physiological attributes, enterotoxin production and surface characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 29-35, 2013.

SRIVASTAVA, A.; LALL, R.; SINHA, A.; GUPTA, R. C. Essential oils. **Nutraceuticals in Veterinary Medicine**. 2019.

SUN, L.; LIAO, K.; LI, Y.; ZHAO, L.; LIANG, S.; GUO, D.; HU, J.; WANG, D. Synergy Between Polyvinylpyrrolidone-Coated Silver Nanoparticles and Azole Antifungal Against Drug-Resistant *Candida albicans*. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**. v. 16, p. 2325-2335, 2016.

TASAKOVSKA, I.; PAJEVA, I.; SHARIF, M. A.; ALOV, P.; FIORAVANZO, E.; KOVARICH, S.; WORTH, A. P.; RICHAZ, A.; YANG, C.; MOSTRAG-SZLICHTYNG,

A.; CRONIN, M. T. D. Quantitative structure-skin permeability relationships. **Toxicology**. v. 387, p. 27-42, 2017.

TelessaúdeRS-UFRGS. Segunda Opinião Formativa: qual o tratamento de pitíriase versicolor? TelessaúdeRS. 2019. Disponível em: < <https://aps.bvs.br/aps/qual-o-tratamento-de-pitirriase-versicolor/>> Acesso em: 22 out. 2023.

UNNIKRISHNAN, S.; DONOVANA, J.; MACPHERSON, R.; TORMEY, D. In-process analysis of pharmaceutical emulsions using computer vision and artificial intelligence. **Chemical Engineering Research and Design**. v. 166, p. 281-294, 2021.

VALENTE, J. de S. S.; BRASIL, C. L.; BRAGA, C. Q.; ZAMBONI, R.; SALLIS, E. S. V.; ALBANO, A. P. N.; ZAMBRANO, C. G.; FRANZ, H. C.; PÖTTER, L.; PANAGIO, L. A.; REIS, G. F.; BOTTON, S. de A.; PEREIRA, D. I. B. Biogenic silver nanoparticles in the treatment of experimental pythiosis Bio-AgNP in pythiosis therapy. **Medical Mycology**. v. 0, p. 1-6, 2020.

VARSHA, M. G.; SHILPA, K.; REVATHI, T. N.; SHANMUKHAPPA, A. G.; LOGANATHAN, E. Telltale signs of skin trespassers: Clues to superficial mycosis. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**. v. 89, n. 1, p. 144-148. 2023.

VERMA, A.; SINGH, V.; SAHOO, A. K. Metal nanoparticle based antibacterial nanocomposites for skin infections. In: Nanotechnology in Skin, Soft Tissue, and Bone Infections. **1 ed. Suíça: Springer International Publishing**, v.1, p.25-48, 2020.

VIEIRA, G. S. **Análise sensorial: terminologia, desenvolvimento de padrões e treinamento de painelistas para avaliação de produtos cosméticos**. 2015. 168 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

WALL, G.; LOPEZ-RIBOT, J. L. Current antimycotics, new prospects, and future approaches to antifungal therapy. **Antibiotics**. v. 9, 445, 2020.

WANG, K.; CHENG, L.; LI, W.; JIANG, H.; ZHANG, X.; LIU, S.; HUANG, Y.; QIANG, M.; DONG, T.; LI, Y.; WANG, J.; FENG, S.; LI, H. Susceptibilities of *Malassezia* strains from pityriasis versicolor, *Malassezia folliculitis* and seborrheic dermatitis to antifungal drugs. **Heliyon**. v. 6, 2020.

YADAV, E.; KUMAR, S.; MAHANT, S.; KHATKAR, S.; RAO, R. Tea tree oil: a promising essential oil. **Journal of Essential Oil Research**. v. 29, n.3, p. 201-213, 2016.

YAZDI, S. J. M.; BAQERSAD, J. Mechanical modeling and characterization of human skin: A review. **J Biomech**. v. 130, 2022.

ZIOTTI, A. B. S. **Nanopartículas de prata sintéticas, biogênicas e o nitrato de prata no metabolismo e desenvolvimento de plantas de sorgo**. 2023. 87 p. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Botucatu - SP, 2023.