



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de São José dos Campos  
Instituto de Ciência e Tecnologia

**GUILHERME RODRIGUES TEODORO**

**ATIVIDADE DA FRAÇÃO ENRIQUECIDA EM  
FENÓLICOS DE *Buchenavia tomentosa* E DE ALGUMAS  
SUBSTÂNCIAS ISOLADAS ANTES E APÓS  
ENCAPSULAÇÃO COM BETA-CICLODEXTRINA EM  
*Candida albicans***

2016

**GUILHERME RODRIGUES TEODORO**

**ATIVIDADE DA FRAÇÃO ENRIQUECIDA EM FENÓLICOS DE  
*Buchenavia tomentosa* E DE ALGUMAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS  
ANTES E APÓS ENCAPSULAÇÃO COM BETA-CICLODEXTRINA EM  
*Candida albicans***

Tese apresentada ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós- Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Microbiologia / Imunologia.

Orientadora: Profa. Adj. Cristiane Yumi Koga Ito  
Co-orientador: Prof. Assoc. Marcos José Salvador

São José dos Campos

2016

Apresentação gráfica e normatização de acordo com:  
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para  
Normalização de Trabalhos Acadêmicos do ICT. Rev. São José dos  
Campos: ICT/UNESP; 2016.

Teodoro, Guilherme Rodrigues

Atividade da fração enriquecida em fenólicos de *Buchenavia tomentosa* e de algumas substâncias isoladas antes e após encapsulação com beta-ciclodextrina em *Candida albicans* / Guilherme Rodrigues Teodoro. - São José dos Campos : [s.n.], 2016.  
82 f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2016.

Orientadora: Cristiane Yumi Koga-Ito

Co-orientador: Marcos José Salvador.

1. *Candida albicans*. 2. *Buchenavia tomentosa*. 3. Terapias complementares. 4. Fitoterapia. I. Koga-Ito, Cristiane Yumi, orient. II. Salvador, Marcos José, co-orient. III. Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho'. V. UNESP - Univ Estadual Paulista. VI. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Achille Bassi e Seção Técnica de Informática, ICMC/USP com adaptações - STATi e STI do ICT/UNESP. Dados fornecidos pelo autor.

## AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 04 de fevereiro de 2016  
E-mail: guilhermerte@uol.com.br

Assinatura: \_\_\_\_\_

## **BANCA EXAMINADORA**

**Profa. Adj. Cristiane Yumi Koga Ito** (Orientadora)

Instituto de Ciência e Tecnologia  
UNESP – Univ Estadual Paulista  
São José dos Campos

**Profa. Adj. Janete Dias Almeida**

Instituto de Ciência e Tecnologia  
UNESP – Univ Estadual Paulista  
São José dos Campos

**Profa. Dra. Sônia Khouri**

Faculdade de Ciências da Saúde  
UNIVAP – Univ do Vale do Paraíba  
São José dos Campos

**Profa. Dra. Fernanda Lourenção Brighenti**

Faculdade de Odontologia  
UNESP – Univ Estadual Paulista  
Araraquara

**Profa. Dr. Antônio Carlos Victor Canettieri**

Faculdade de Ciências da Saúde  
UNIVAP – Univ do Vale do Paraíba  
São José dos Campos

São José dos Campos, 04 de fevereiro de 2016.

## Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus pelo dom da vida e por me conceder tantas bênçãos ao longo desta empreitada chamada pós-graduação.

Aos meus pais Juscelino de Castro Teodoro e Rosa Maria Rodrigues Teodoro e meus irmãos Juliana Teodoro Pacheco e Ricardo Rodrigues Teodoro, por serem meu alicerce nas horas de dificuldades e celebrarem comigo nos momentos de alegria. Eu os amo muito!

À minha querida orientadora Profa. Adj. Cristiane Yumi Koga Ito, mas que prefere ser chamada de Cris, pelos longos anos de convivência e aprendizado e por sempre ter acreditado em mim. Cris, você é um ser humano único em bondade, simplicidade e competência. Muito obrigado por tudo!

Aos minhas queridas “meninas” Clélia, Márcia, Aline C, Aline S, Gabi, Juliana e aos meus parceiros Douglas e Daniel. Pessoal, o resultado desta tese tem um pouco do trabalho e esforço de cada um de vocês. Muito obrigado!

Ao Professor Chaminda Jayampath Seneviratne, ou simplesmente Jaya, por ter me aceito em seu laboratório na National University of Singapore na realização do meu doutorado sanduíche.

Aos meus novos amigos Kassapa, Preethi, Karish, Thuyen, Mandita, Thulasi e Nilesh os quais tive o prazer de conviver durante meu doutorado sanduíche e que também muito me ajudaram na adaptação e execução dos experimentos. *Thank you very much guys!*

Ao meu co-orientador Prof. Assoc. Marcos José Salvador pelos anos de parceria e pela orientação das etapas químico-farmacológicas deste trabalho.

Aos meus queridos amigos da Universidade do Vale do Paraíba, em especial a Profa. Dra. Sônia Khouri, ou simplesmente Soninha, pelos anos de convivência e por sempre torcerem por mim.

Aos funcionários do Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista (ICT-Unesp), pelo apoio ao longo destes anos de pós-graduação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), pela concessão da bolsa de doutorado e do auxílio pesquisa (respectivamente processos 2012/16805-5 e 2013/00037-1) os quais garantiram o suporte financeiro para realizar este trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) que através do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (processo 99999.000217/2014-00) garantiu o suporte financeiro para realização do meu Doutorado Sanduíche na National University of Singapore.

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram na execução deste trabalho.

*“Ninguém vence sozinho, nem no campo,  
nem na vida!”*

*Papa Francisco*

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	09
<b>ABSTRACT</b> .....	10
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	13
<b>2.1 Plantas medicinais</b> .....	13
2.1.1 Plantas medicinais no Brasil .....	14
<b>2.2 Família Combretaceae</b> .....	14
2.2.1. <i>Buchenavia tomentosa</i> .....	15
<b>2.3 Compostos fenólicos</b> .....	16
2.3.1 Flavonóides .....	16
2.3.2 Taninos .....	17
2.3.3 Ácidos fenólicos .....	17
<b>2.4 Ciclodextrinas</b> .....	18
<b>2.5 Leveduras do gênero <i>Candida</i></b> .....	18
2.5.1 <i>Candida albicans</i> .....	19
2.5.2 Fatores de virulência de <i>Candida</i> .....	20
2.5.3 Genes relacionados à virulência em <i>C. albicans</i> .....	21
<b>2.6 Candidose eritematosa</b> .....	22
<b>3 PROPOSIÇÃO</b> .....	24
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	25
<b>4.1 Aspectos éticos</b> .....	25
<b>4.2 Obtenção das diferentes frações das folhas de <i>Buchenavia tomentosa</i></b> .....	25
<b>4.3 <i>Screening</i> inicial da atividade antifúngica e determinação da fração enriquecida em fenólicos</b> .....	26



<b>4.4 Caracterização do perfil químico da fração enriquecida das folhas de <i>B. tomentosa</i></b> .....	28
<b>4.5 Suscetibilidade das cepas de <i>Candida albicans</i> isoladas de candidose eritematosa frente às diversas substâncias com atividade antifúngica</b> .....	29
4.5.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) da fração enriquecida (FE) de <i>Buchenavia tomentosa</i> e substâncias isoladas .....	29
<b>4.6 Avaliação da atividade da FE e das substâncias isoladas sobre fatores de virulência de <i>Candida albicans</i></b> .....	30
4.6.1 Determinação da concentração de erradicação do biofilme (CEB) mono-espécie <i>Candida albicans</i> .....	30
4.6.2 Ação sobre a formação de biofilme .....	31
4.6.3 Ação sobre a produção de proteinase e fosfolipase .....	31
4.6.4 Ação sobre a morfogênese de <i>C. albicans</i> (transição levedura-hifa) .....	33
4.6.5 Ação sobre a aderência de <i>Candida albicans</i> às células epiteliais bucais .....	33
4.6.6 Ação sobre a expressão dos genes SAPs, HWP1 e ALS .....	34
4.6.6.1 Formação e tratamento dos biofilmes .....	35
4.6.6.2 Extração do RNA .....	36
4.6.6.3 Síntese de DNA complementar (cDNA) .....	37
4.6.6.4 PCR em tempo real (RT PCR) .....	38
<b>4.7 Obtenção e caracterização química do encapsulado</b> .....	39
4.7.1 Diagrama de solubilidade .....	39
4.7.2 Secagem por atomização dos complexos de inclusão e detecção do percentual de ácido gálico .....	40
4.7.3 Calorimetria diferencial de varredura .....	41
4.7.4 Microscopia eletrônica de varredura .....	41
<b>4.8 Avaliação da efetividade antifúngica <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> e citotoxicidade dos encapsulados</b> .....	42

4.8.1 Avaliação da efetividade antifúngica <i>in vitro</i> .....	42
4.8.2 Avaliação da efetividade <i>in vivo</i> em modelo experimental de candidose eritematosa em ratos .....	42
4.8.2.1 Inoculação .....	43
4.8.2.2 Análise histopatológica e quantificação de hifas .....	44
4.8.3 Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	45
<b>4.9 Análise estatística .....</b>	<b>46</b>
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>47</b>
<b>5.1 Obtenção das diferentes frações das folhas de <i>Buchenavia tomentosa</i> .....</b>	<b>47</b>
<b>5.2 <i>Screening</i> inicial da atividade antifúngica e determinação da fração enriquecida em fenólicos.....</b>	<b>47</b>
<b>5.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) da fração enriquecida (FE) de <i>Buchenavia tomentosa</i> e substâncias isoladas .....</b>	<b>48</b>
<b>5.4 Avaliação sobre fatores de virulência de <i>Candida albicans</i> .....</b>	<b>49</b>
<b>5.5 Obtenção e caracterização química do encapsulado .....</b>	<b>54</b>
<b>5.6 Avaliação da efetividade antifúngica <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> dos encapsulados .....</b>	<b>56</b>
<b>5.7 Teste de citotoxicidade .....</b>	<b>58</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>60</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>64</b>
<b>8 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>65</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>80</b>

Teodoro GR. Atividade da fração enriquecida em fenólicos de *Buchenavia tomentosa* e de algumas substâncias isoladas antes e após encapsulação com beta-ciclodextrina em *Candida albicans* [tese]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2016.

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a efetividade frente a *Candida albicans* da fração enriquecida em fenólicos (FE) das folhas de *Buchenavia tomentosa* além das substâncias ácido gálico (AG), corilagina, kaempferol e vitexina, substâncias fenólicas que foram previamente detectadas no extrato aquoso de *B. tomentosa* livres ou encapsuladas em ciclodextrinas. Para tal, foi realizado teste de microdiluição com cepas padrão e isolados clínicos e análise química da FE por espectrometria de massa (ESI-MS). Detectou-se que o extrato acetônico foi a FE e AG foi a substância fenólica mais eficiente contra *C. albicans*. O efeito de FE e AG contra os fatores de virulência de *C. albicans* foram analisados. FE e AG foram encapsulados em 2-hidroxiopropil-beta-ciclodextrina e tiveram sua análise química realizada. As CIMs e CFMs dos encapsulados foram determinadas, porém apenas o AG encapsulado teve sua ação anti-biofilme e *in vivo* verificadas. A citotoxicidade de AG e FE livres e encapsulados foi determinada. As CIMs variaram de 5,0 e 0,625 mg/ml para o ácido gálico e 2,5 e 0,019 mg/ml para FE. AG e as outras moléculas foram encontradas na FE. Não foram encontrados CFMs. Os fenólicos estudados também foram encontrados em FE por ESI/MS. Tanto FE quanto AG tiveram efeito direto nos fatores de virulência de *C. albicans*, exceto sobre a secreção de exoenzimas. Não houve diferença na CIM entre as substâncias livres e encapsuladas. AG encapsulado teve melhor ação anti-biofilme do sua forma livre. Foi verificada melhora clínica de lesões eritematosas no palato de ratos, porém não foi possível. A citotoxicidade das substâncias livres ou encapsuladas variou de moderada a leve para FE e foi moderada para AG. Após as análises, observou-se o efeito anti-*C. albicans* de FE e AG. AG encapsulado apresentou promissor efeito anti-biofilme e aparente melhora clínica nas lesões sugestivas de candidose eritematosa na mucosa palatar dos ratos.

Palavras-chaves: *Candida albicans*. *Buchenavia tomentosa*. Terapias complementares. Fitoterapia.

Teodoro GR. Activity of phenolic enriched fraction of Buchenavia tomentosa and some isolated compounds before and after encapsulation with beta-cyclodextrin in Candida albicans. [doctorate thesis]. São José dos Campos: Institute of Science and Technology, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2016.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effectiveness against Candida albicans of fraction enriched in phenolic (FE) of Buchenavia tomentosa beyond substances gallic acid (GA), corilagin, kaempferol and vitexin, phenolic substances previously detected in the aqueous extract of B. tomentosa, free or encapsulated in cyclodextrins. Microdilution test with standard strains and clinical isolates besides the chemical analysis of FE by mass spectrometry (ESI-MS) were carried out. The acetone extract was the FE and AG was the most efficient phenolic substance against C. albicans. The effect of FE and AG against the virulence factors of C. albicans was also analyzed. FE and AG were encapsulated into 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD) and had their chemical analyses made. MICs and MFCs of encapsulated have been determined. Solely the GA encapsulated had its anti-biofilm and in vivo action verified. Cytotoxicity of free and encapsulated GA and FE were determined. The MIC ranged from 5,0 to 0,625 mg/ml for GA and 2,5 and 0,019 mg/ml for FE. MFCs values were not found. All phenolics molecules were found in FE by ESI/MS. AG and FE had a direct effect on virulence factors of C. albicans, except on the secretion of exoenzymes. There was no difference in the CIM between free and encapsulated substances. The anti-biofilm effect was better in GA encapsulated than its free form. A clinical improvement of suggestive erythematous lesions on the palate of rats was observed, although the hyphae were not found in the palatal mucosa. The cytotoxicity for all substances was moderated. After the analysis, we observed the anti-C. albicans effect of GA and FE. AG encapsulated showed promising anti-biofilm effect and apparent clinical improvement in lesions suggestive of erythematous candidiasis in palatal mucosa of rats.

Keywords: Candida albicans. Buchenavia tomentosa. Complementary therapies. Phytotherapy.

## 1 INTRODUÇÃO

Um dos grandes desafios para a utilização de plantas medicinais como alternativas terapêuticas é a escassez de evidências científicas que possam assegurar seu uso correto (World Health Organization, 2002). A Organização Mundial de Saúde vem incentivando estudos com plantas no intuito de sanar as lacunas da falta de evidências científicas para seu uso de forma segura. Seguindo esta tendência mundial, o Governo Federal brasileiro criou a “Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterapia”, uma vez que a flora brasileira é uma das mais vastas do mundo e ainda pouco se sabe sobre seu potencial fitoterápico (Brasil, 2006). Dentro deste contexto, o Pantanal Mato-grossense destaca-se por sua vasta flora (Pott et al., 2011). Todavia, estudos relevantes sobre tal flora devem ser mais bem explorados. Dentre plantas com conhecidas atividades biológicas tais como antimicrobianas, anti-inflamatórias e antioxidantes e que ocorrem no Pantanal, destacam-se as da família Combretaceae (Pott et al., 2011). Tais atividades provavelmente se dão pela presença de compostos bioativos, como os compostos fenólicos (Newman, Cragg, 2012).

Os compostos fenólicos estão amplamente distribuídos no reino vegetal e são definidos como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Podemos destacar o grupo dos flavonóides, taninos e dos ácidos fenólicos (Chirinos et al., 2009).

A atividade antimicrobiana, inclusive antifúngica da planta *Buchenavia tomentosa* (Combretaceae) já foi descrita na literatura (Brighenti et al., 2014; Teodoro et al., 2015). Além disso, compostos fenólicos com atividade antifúngica, anteriormente descritas na literatura

científica tais como ácido gálico, corilagina, vitexina e kaemferol, foram encontrados em extratos preparados a partir desta planta. Todavia, pouco se sabe a respeito dos seus mecanismos de ação e ainda não foi relatada na literatura a influência sobre os fatores de virulência dos fungos.

Ciclodextrinas (CDs) são carreadores macrocíclicos, capazes de aumentar a solubilidade aquosa de fármacos pouco solúveis, além de aumentar sua biodisponibilidade e estabilidade (Teixeira et al., 2013).

Infecções por leveduras do gênero *Candida* vêm aumentando consideravelmente nas últimas décadas, principalmente em indivíduos imunocomprometidos (Aperis et al., 2006; Spellberg et al., 2012). As infecções por micro-organismos deste gênero são intermediadas por seus fatores de virulência. São esses fatores a adesão às células do hospedeiro, secreção de enzimas hidrolíticas, formação de hifas e desenvolvimento de biofilme (Williams et al., 2011). O controle da expressão destes fatores de virulência realizados é realizado por genes de virulência, tanto os relacionados a produção de enzimas hidrolíticas (família SAP), quanto os relacionados à aderência, como os da família ALS e o gene HWP1 (Naglik et al., 1999; Staab et al., 1999; Hoyer, 2001).

A candidose eritematosa associada ao uso de prótese é de ocorrência comum, sendo principalmente causada por *C. albicans* (Regezi, 2012; Sanita et al., 2012). No tratamento convencional desta doença, recidivas são comuns (Gendreau, Loewy, 2011). Logo, a busca de alternativas de tratamento é necessária. Assim, o presente estudo propõe estudar os efeitos antifúngicos *in vivo* e *in vitro* do extrato enriquecido por componentes fenólicos das folhas de *B. tomentosa*, de moléculas fenólicas isoladas com poder antifúngico deles isoladas ou encapsuladas em ciclodextrinas.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Plantas medicinais**

Medicamentos tradicionais a base de plantas são utilizados por cerca de 80 % da população mundial (Wangchuk et al., 2011) e seu uso pelos seres humanos supera os 1000 anos (Scartezzini, Speroni, 2000). Assim sendo, plantas são importantes fontes de novas substâncias bioativas e o interesse econômico para a descoberta de fármacos é alto. Estima-se que cerca de 25 % dos mais modernos medicamentos são direta ou indiretamente derivados de plantas medicinais (Newman, Cragg, 2012). O mercado mundial de medicamentos derivados de plantas girou cerca de 8,3 bilhões de dólares em 2008, e existe a expectativa de aumento destes números (World Health Organization, 2011). O número estimado de espécies de plantas superiores descritas é de 250.000 a 750.000. Entretanto, aproximadamente 119 substâncias extraídas a partir de vegetais para uso na medicina são obtidas a partir de apenas cerca de 90 plantas (Farnsworth, 1997).

Apesar do seu extensivo uso, as evidências científicas do uso medicinal de plantas ainda são insuficientes para garantir a qualidade de tais produtos. Para sanar este desafio, a Organização Mundial de Saúde tem incentivado estudos científicos relevantes com plantas desde 2002, no intuito de criar evidências consistentes com relação à sua segurança e efetividade (World Health Organization, 2002, 2011), acreditando que uma vez que estes estudos utilizam técnicas sofisticadas, o estabelecimento de uma relação racional entre o seu uso e a cura das

doenças por meio de substâncias biologicamente ativas presentes nas drogas vegetais seja possível (Ghisalberti, 2007).

### 2.1.1 Plantas medicinais no Brasil

A flora brasileira é mundialmente conhecida e as aproximadamente 40.000 espécies de plantas conhecidas equivalem a 1/5 da flora mundial (Maciel et al., 2002; Brandao et al., 2013). Porém, estudos relevantes foram realizados em apenas 0,4 % desta flora (Brito, Brito, 1993). Acompanhando as diretrizes da Organização Mundial da Saúde (World Health Organization, 2002), o Governo Federal, elaborou a “Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterapia” a fim de “garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional” (Brasil, 2006), tratando-se de um incentivo a mais estudos da flora nacional. Além disso, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) intensificou o controle do uso de produtos fitoterápicos no Brasil, sendo este liberado para uso apenas após total comprovação científica de sua eficácia e de sua segurança (Brasil, 2010; Brandao et al., 2010).

## 2.2 Família Combretaceae

O Pantanal Mato-grossense é uma das maiores extensões contínuas do planeta e foi reconhecida como Reserva da Biosfera pela UNESCO no ano 2000 (Embrapa, 2015). Entretanto, apesar



das mais de 1800 espécies de plantas descritas neste bioma (Pott et al., 2011), poucos estudos científicos relevantes com tais vegetais foram realizados.

No Pantanal, são encontradas algumas plantas pertencem à família Combretaceae (Pott et al., 2011; Bieski et al., 2012). Esta ocorre nas regiões tropicais e subtropicais do mundo e inclui 20 gêneros e aproximadamente 475 espécies. No Brasil, ocorrem seis gêneros e cerca de 78 espécies (da Silva, Valente, 2005). Extratos de plantas desta família têm sido citados na literatura como promissores agentes anti-*Candida*, inclusive contra *C. albicans*, tais como dos gêneros *Combretum*, *Terminalia* e *Buchenavia* (Baba-Moussa et al., 1999; Masoko et al., 2005, 2007; Govindarajan et al., 2006).

#### 2.2.1. *Buchenavia tomentosa*

Conhecida popularmente como Tarumarana, *Buchenavia tomentosa* é descrita como uma árvore com altura média de 26 metros e o diâmetro do tronco variando entre 21 e 35 centímetros. No Brasil, é encontrada nos Estados do Amazonas, Pará, Piauí, Goiás, Mato Grosso e Minas Gerais (da Silva, Valente, 2005). O fruto desta árvore é comestível e o preparo de suco a partir deste é comum. As folhas são utilizadas para preparo de chá e a madeira é usada para confecção de porteiras e caibros e como lenha (Pott, Pott, 1994). Recentemente, a ação antibacteriana (Brighenti et al., 2014) e anti-*Candida* (Teodoro et al., 2015) de diversos extratos desta planta foram descritos. Entretanto, ainda não foi descrita o mecanismo de ação dos extratos de *B. tomentosa* nas leveduras bem como sua influência nos fatores de virulência desses micro-organismos.

Teodoro et al. (2015) encontraram substâncias bioativas como ácido gálico (ácido fenólico), corilagina (tanino), kaempferol e vitexina (flavonóides), foram encontradas em extrato aquoso das folhas de *B. tomentosa*, bem como comprovaram a ação anti-*Candida* destas moléculas. Além disso, outros trabalhos vêm demonstrando semelhante ação destas moléculas contra leveduras do gênero *Candida* (Salvador et al., 2004b; Yordanov et al., 2008; Rangkadilok et al., 2012; Alves et al., 2014).

## 2.3 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são moléculas encontradas em diversos vegetais. Os mais conhecidos são os ácidos fenólicos, ácido benzóico e cinâmico, cumarinas, taninos, ligninas, lignanas e flavonóides. Nas últimas três décadas diversos estudos têm sido feitos com estas substâncias, tanto na extração, identificação e quantificação destas moléculas, no intuito de sua utilização como medicamentos e suplementos alimentares (Khoddami et al., 2013).

### 2.3.1 Flavonóides

São compostos fenólicos cuja sua estrutura básica consiste em um núcleo fundamental, constituído de quinze átomos de carbono arranjados em três anéis (C6-C3-C6), sendo dois anéis fenólicos substituídos e um pirano acoplado ao primeiro anel fenólico (Di Carlo et al., 1999). Plantas medicinais e condimentares que contêm flavonóides são usadas há milhares de anos na medicina oriental. No entanto, a

despeito da literatura avaliada, ainda são pouco usados terapêuticamente na medicina popular do ocidente (Middleton et al., 2000).

### 2.3.2 Taninos

De acordo com Bruneton (1999) e Waterhouse (2002), são polifenóis que são divididos em 2 grupos: taninos hidrolisáveis (polímeros de ácido elágico ou elagotânicos e do ácido gálico ou galotaninos) e os taninos condensados, que resultam da condensação de monômeros de flavan-3-ol. Essas moléculas têm grande potencial para formar ligações com outras moléculas das plantas em que são encontrados (Pereira et al., 2009). As propriedades antioxidantes de taninos são responsáveis por interessantes propriedades biológicas como anti-inflamatórias e antimicrobianas (Pereira et al., 2009; Rangkadilok et al., 2012).

### 2.3.3 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos são outra das principais classes de compostos fenólicos dentro do reino vegetal. Raramente são encontrados de forma livre, sendo normalmente encontrados como ésteres, amidas ou glicosídeos. A variação de ácidos fenólicos se dá pelo número e localização de grupos hidroxila no anel aromático (Pereira et al., 2009). Os ácidos fenólicos possuem duas estruturas principais: ácido hidroxibenzoico e hidroxicinâmico.

## 2.4 Ciclodextrinas

Ciclodextrinas (CDs) são carreadores macrocíclicos, capazes de complexar e estabilizar um largo espectro de substâncias. As CDs tem várias aplicações dentro deste contexto por serem inertes, não-tóxicas e carreadora de compostos ativos em formulações farmacêuticas. A formação de complexos de inclusão em ciclodextrinas tem sido estudada com resultados que demonstram melhora nas propriedades farmacológicas de fármacos aumentando a eficácia e a segurança dos mesmos. Na indústria farmacêutica, ciclodextrinas têm sido usadas como complexadores, para aumentar a solubilidade aquosa de fármacos pouco solúveis e para aumentar sua biodisponibilidade e estabilidade (Teixeira et al., 2013).

A técnica de encapsulamento de óleos essenciais em nanocápsulas e beta-ciclodextrina tem sido aplicadas com sucesso em várias áreas utilizando, por exemplo, óleo essencial de alho (Ayala-Zavala, González-Aguilar, 2010) e capim-limão (Weishmer et al., 2010). Kalogeropoulos et al. (2009) relataram o encapsulamento em CDs de extrato etanólico de própolis obtendo resultados positivos. Teixeira et al. (2013) avaliando complexos de clorexidina com CD, relataram que a atividade antimicrobiana foi significativamente aumentada pelo processo de encapsulação.

## 2.5 Leveduras do gênero *Candida*

Estes micro-organismos são considerados patógenos oportunistas, causadores de infecções principalmente em indivíduos imunodeficientes, como os portadores do vírus HIV, pacientes que

estejam sob quimioterapia, transplantados em uso de medicamentos imunossupressores e diabéticos (Richardson, 2005; Aperis et al., 2006). Nos Estados Unidos, estão em quarto lugar dentre os micro-organismos causadores de septicemia (Perlroth et al., 2007). Estima-se que as candidoses invasivas afetem mais de 250.000 pessoas no mundo causando mais de 50.000 mortes por ano podendo chegar até a 50 % de letalidade (Arendrup, 2010).

A adesão a superfícies, o dimorfismo (formação de hifas) e a formação de biofilme em superfícies biológicas ou não (catéteres, próteses) são fatores de virulência fundamentais expressos por estas leveduras (Raad, Hanna, 2002; Ramage et al., 2006; Modrzewska, Kurnatowski, 2015).

### 2.5.1 *Candida albicans*

*C. albicans* continua sendo a espécie mais patogênica aos seres humanos, apesar do advento de infecções por espécies de *Candida* não-*albicans* e outros fungos. Esta levedura é considerada um micro-organismo oportunista, sendo causa de infecções bucais e do trato genitourinário, podendo também causar severas infecções sistêmicas, principalmente em indivíduos imunocomprometidos, como transplantados, sob quimioterapia, portadores de AIDS e Hepatite C (Pitarch et al., 2006; Spellberg et al., 2012). O dimorfismo deste fungo o auxilia na formação do biofilme e invasão tecidual, sendo estes importantes fatores de virulência (Stoldt et al., 1997; Mayer et al., 2013).

### 2.5.2 Fatores de virulência de *Candida*

A aderência de *Candida* em superfícies bióticas e abióticas é fundamental para o início da colonização, seja diretamente nas células (epiteliais, endoteliais e fagocíticas) ou em artefatos como catéteres e próteses. Esta característica permite a permanência destes micro-organismos em seu hospedeiro. As leveduras deste gênero se aderem a vários tipos de células (Nobile et al., 2008; Modrzewska, Kurnatowski, 2015). Esta aderência é intermediada por adesinas presentes nestes micro-organismos sendo as principais mananas, manoproteínas, beta-glucanos e quitina (Netea et al., 2008).

Dentre as enzimas hidrolíticas secretadas por *Candida* spp., as proteinases e fosfolipases estão entre as mais importantes. Proteinases auxiliam estas leveduras a evadirem do sistema imunológico do hospedeiro, pois podem hidrolizar as imunoglobulinas do tipo IgA secretora presente nas mucosas. Além disso, podem diretamente destruir o tecido. As fosfolipases também estão envolvidas com a invasão e destruição do tecido do hospedeiro e sua atividade é acentuada quando ocorre o contato das hifas produzidas por estas leveduras com este tecido (Williams et al., 2011; Mayer et al., 2013).

Modificações morfológicas ocorrem nas leveduras do gênero *Candida*, principalmente *C. albicans*, dependendo das condições em que se encontram. As possíveis morfologias observadas são hifas, pseudo-hifas ou leveduras, sendo que a formação de hifas tenha um importante papel na invasão de tecidos e biomateriais e também confere maior resistência aos fagócitos quando comparados com as formas leveduriformes (Jayatilake et al., 2006; Williams et al., 2011; Mayer et al., 2013).

A formação de biofilme também é importante na patogenicidade de *Candida* porque ele se torna uma barreira contra a

penetração de fatores imunológicos do hospedeiro e de drogas antimicrobianas (Vuong et al., 2004; Fanning, Mitchell, 2012), pois a matriz extracelular polissacarídica formada no biofilme, inibe a difusão das moléculas dos antimicrobianos para o interior do biofilme. Além disso, a ação iônica do biofilme limita a ação dos antimicrobianos (Al-Fattani, Douglas, 2004).

### 2.5.3 Genes relacionados à virulência em *C. albicans*

A levedura *C. albicans* transita da forma comensal para a forma infecciosa através de alterações transcricionais, sendo que nesta condição há maior expressão dos genes que codifica enzimas hidrolíticas e adesinas (Calderone, Fonzi, 2001; Hube, 2004). Além disso, a formação de hifas e a comutação fenotípica estão também envolvidas na virulência do fungo (Hube, 2004).

Dentre os principais genes que codificam enzimas hidrolíticas com atividade nas mucosas, destacam-se os da família *Secreted aspartyl proteinases* também conhecidos como SAPS. Além disso, tais genes auxiliam na adesão de *C. albicans* ao tecido (Naglik et al., 1999; Tsang et al., 2007; Marcos-Arias et al., 2011). Esta família é composta por 10 genes particularmente proeminente e diversificada, que desempenham um papel importante na patogênese da candidose. Estes são coordenadamente regulados dependendo das condições ambientais e da morfologia celular, isto é, de levedura ou hifas, que também são importantes no desenvolvimento do biofilme por *C. albicans* (Naglik et al., 1999; Ramage et al., 2005; Rajendran et al., 2010).

Genes pertencentes à família *Agglutinin-like sequence*, ou simplesmente ALS, incluem oito genes que codificam grandes glicoproteínas da superfície celular, embora nem todos estejam presentes

em todas as cepas de *Candida albicans*, uma vez que os genes ALS de 1 a 4 codificam adesinas específicas para tubos germinativos e hifas, enquanto os genes ALS de 5 a 7 e ALS 9 estão associados com blastosporos. Como hipótese, acredita-se que estas glicoproteínas podem ser adesinas envolvidos principalmente em interações patógeno-hospedeiro (Hoyer, 2001; Hoyer et al., 2008; Murciano et al., 2012).

A adesão via *Hyphal wall protein*, conhecido como HWP1 (Staab et al., 1999), é um exemplo surpreendente da adaptação fúngica ao hospedeiro e pode ser descrita como um mimetismo molecular, uma vez que a região ativa amino-terminal do HWP1 é reconhecida como um substrato para a atividade da enzima transglutaminase do hospedeiro, a qual está associada à superfície das células do epitélio. Isto resulta em ligações cruzadas isopeptídicas das proteínas associadas às células epiteliais com o HWP1, proporcionando uma ligação covalente entre *C. albicans* e o epitélio (Staab et al., 1999, 2004).

Os genes ALS e HWP1 codificam glicoproteínas de superfície ancoradas por glicosilfosfatidilinositol (GPI), as quais podem mediar a adesão de *C. albicans* às superfícies mucosas (Hoyer et al., 2008).

## 2.6 Candidose eritematosa

A candidose eritematosa é a doença mais comumente relacionada à utilização de próteses odontológicas, sendo *C. albicans* geralmente relacionada como um dos agentes etiológicos. A incidência pode chegar a mais de 80 % dos portadores de próteses totais (Figueiral et al., 2007; Regezi et al., 2012; Sanita et al., 2012). O biofilme bacteriano presentes nestas próteses bem como sua rugosidade são fatores



predisponentes para crescimento de *C. albicans* e consequente instalação da infecção (Arita et al., 2005; O'Donnell et al., 2015).

Os antifúngicos convencionais possuem algumas consideráveis limitações, tais como espectro inadequado de atividade, pequena quantidade de drogas disponíveis, pequeno índice de tolerância, interações com outras drogas, perfil farmacocinético inadequado, alto custo e importantes efeitos tóxicos (Bates et al., 2001; Johnson, Perfect, 2003; Yu et al., 2005; Lewis, Graybill, 2008). Além disso, os casos de resistência de *Candida* spp. a estes fármacos vêm aumentando (Borg-von Zepelin et al., 2007; Panizo et al., 2009; Lee et al., 2010; Pfaller et al., 2010). No caso específico do tratamento de candidose eritematosa associado ao uso de prótese, os antifúngicos convencionais são eficazes no tratamento agudo da doença, porém rápidas recorrências poucos dias após a suspensão do tratamento costuma ser observado, principalmente quando associadas à má higienização da prótese (Gendreau, Loewy, 2011). Para oferecer alternativas ao tratamento com tais antifúngicos, alguns tratamentos alternativos a essas doenças têm sido sugeridos e com grande interesse (Silver, Bostian, 1993). Para candidose eritematosa, podemos citar o uso de própolis (Santos et al., 2008), bicarbonato de sódio (Gawande et al., 2008) e vinagre de maçã (Mota et al., 2015).

A descoberta de compostos naturais com potencial antifúngico pode ser uma boa alternativa para tais tratamentos (Schmourlo et al., 2005). A utilização de extratos das folhas de *B. tomentosa* pode ser uma destas alternativas, uma vez que impacto de compostos naturais sobre doenças infecciosas humanas tem merecido muito interesse nas últimas décadas (Leitao et al., 2004; Takarada et al., 2004).

### 3 PROPOSIÇÃO

#### 3.1 Proposição geral

Avaliar a efetividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* frente à *Candida albicans* da fração enriquecida em fenólicos (FE) das folhas de *Buchenavia. tomentosa* e das substâncias isoladas detectadas no extrato aquoso bruto de *B. tomentosa* livres ou encapsuladas em ciclodextrinas.

#### 3.2 Proposições específicas

- a) Obter a fração enriquecida em fenólicos (FE) a partir do extrato aquoso bioativo das folhas de *B. tomentosa*;
- b) Avaliar a atividade antifúngica das substâncias isoladas ácido gálico, corilagina, kaempferol e vitexina;
- c) Avaliar a efetividade *in vitro* das substâncias isoladas e FE por meio de valores de concentração inibitória de formação, erradicação de biofilme de *C. albicans* e ação sobre fatores de virulência;
- d) Encapsular em beta-ciclodextrina a fração FE e a substância isolada mais ativa;
- e) Caracterizar quimicamente e biologicamente os encapsulados, avaliando atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* e citotoxicidade.

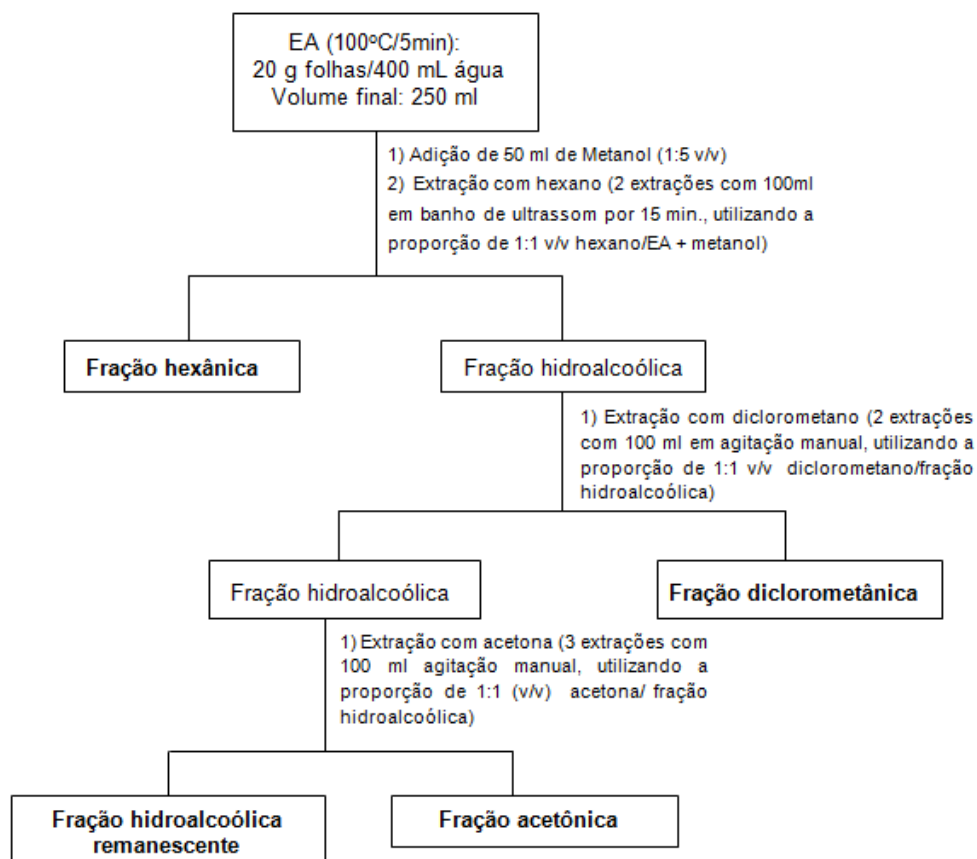
## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) com animais sob o número de protocolo **09/2012-PA/CEP** e seres humanos sob o número de **processo 367.923** sendo que para este último, o projeto foi cadastrado na Plataforma Brasil (ANEXOS A e B).

### 4.2 Obtenção da fração enriquecida em fenólicos das folhas de *Buchenavia tomentosa*

Esta etapa foi realizada a partir do extrato aquoso (5 minutos a 100 °C) das folhas de *B. tomentosa* previamente obtida (Teodoro et al., 2015). Este foi submetido ao processo de extração líquido-líquido (Salvador, Dias, 2004a; Salvador et al., 2006; Souza et al., 2007), visando diminuir a complexidade da mistura, separando em frações contendo constituintes com diferentes polaridades (Figura 1). Utilizou-se acetona para concentrar as moléculas fenólicas, sendo esta fração então denominada de enriquecida em fenólicos (FE)



**OBS: Os solventes orgânicos das frações hexânica, diclorometânica, acetônica e hidroalcoólicas foram removidos em rotaevaporador sob pressão reduzida.**

Figura 1- Esquema da partição do extrato aquoso (EA) de *Buchenavia tomentosa* para obtenção das frações.

### 4.3 Screening inicial da atividade antifúngica

A metodologia utilizada para triagem da atividade antifúngica in vitro dos extratos foi a de difusão em ágar pela técnica do poço com dupla camada de ágar (Holder, Boyce, 1994). Foram utilizadas as cepas de *C. albicans* SC 5314 e ATCC 18804. Primeiramente foi obtida uma camada base, onde 5 ml de caldo RPMI 1640 (sem bicarbonato de sódio, com L-alanina, tamponado em pH 7.0 com MOPS:

ácido 3-[N-morfolino]propanesulfônico) 2 vezes concentrado acrescido de 5 ml de ágar a 3 % com temperatura de aproximadamente 50 °C, foram colocados em placas de Petri estéreis (90 x 15 mm) totalizando um volume de 10 ml. Os micro-organismos foram semeados em ágar Sabouraud dextrose por 24 horas e incubados 37 °C. Em seguida, inóculos foram preparados em solução fisiológica estéril 0,9 % na concentração  $10^6$  células/ml utilizando espectrofotômetro, com densidade óptica (OD) de 0,380 em 550 nanômetros (nm) conforme prévia padronização (Teodoro et al., 2015).

Para obtenção da camada *seed*, no mesmo meio de cultura acima descrito (total de 10 ml) foi adicionado 100 µl do inóculo. Após homogeneização, o conteúdo foi vertido sobre a camada base. O volume final (camada base + camada *seed*) na placa foi de 20 ml. Orifícios de cerca de 5 mm de diâmetro foram feitos com canudos esterilizados nas placas já com os meios solidificado. Posteriormente, os orifícios receberam 50 µl das substâncias. Todas as substâncias, com exceção da fração acetônica, foram ressuspensas no meio RPMI 1640 nas mesmas condições acima com adição de 5 % de DMSO, obtendo-se uma concentração final de 10 mg/ml. Como controle negativo foi utilizado o próprio meio de cultura acrescido de 5 % de DMSO, com exceção da fração acetônica para a qual foi utilizado somente o meio de cultura. Como controle positivo, foi utilizado anfotericina B na concentração 2 µg/ml. Após uma hora, as placas foram incubadas em estufa a 37 °C durante 24 horas. Depois deste período, os halos formados foram medidos e os resultados anotados.

A fração escolhida teve seu perfil químico analisado para verificação da presença de compostos fenólicos, principalmente os que já previamente foram identificados nesta planta como ácido gálico, vitexina, corilagina e kaempferol (Teodoro et al., 2015), para a determinação da fração enriquecida em fenólicos (FE).

#### **4.4 Caracterização do perfil químico da fração enriquecida das folhas de *B. tomentosa***

Este perfil foi obtido por espectrometria de massas por injeção direta por eletrospray (ESI-MS) visando à caracterização dos constituintes majoritários presentes (Schinor et al., 2004, 2006). As amostras foram diluídas em uma solução contendo 50 % (v/v) de metanol grau cromatográfico e 50 % (v/v) de uma solução de água deionizada e 0,5 % de hidróxido de amônio (Merck, Darmstadt, Alemanha). As análises ESI-MS foram realizadas por injeção direta no Espectrômetro de Massas Quadrupolar – Micromass da Waters, por eletro spray em modo negativo e modo positivo e as condições gerais foram: temperatura da fonte de 100 °C, a tensão capilar de 3,0 kV e a tensão do cone de 30 V. A análise estrutural de íons no espectro de massa de extrato e frações foram realizadas pela avaliação dos fragmentos gerados em análise ESI-MS. Os íons com relação massa/carga ( $m/z$ ) de interesse foram selecionados e submetidos a colisões com argônio. A pressão do gás de colisão foi otimizada para a produção de fragmentação extensa do íon sob investigação.

Os constituintes foram identificados por comparação de seus espectros de fragmentação ESI-MS com espectro de amostras-padrão autênticas do banco de substâncias padrão do grupo de pesquisa do Laboratório de Farmacognosia, Tecnologia Fitofarmacêutica e Bioensaios do IB-Unicamp e com dados da literatura (Pascoal et al., 2011).

#### **4.5 Suscetibilidade das cepas de *Candida albicans* isoladas de candidose eritematosa frente às diversas substâncias com atividade antifúngica**

##### **4.5.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) da fração enriquecida (FE) de *Buchenavia tomentosa* e substâncias isoladas**

Nesta etapa foi utilizada a FE previamente obtida além das substâncias ácido gálico (AG), corilagina, vitexina e kaempferol, todas obtidas comercialmente. Foram utilizadas as cepas de referência *Candida albicans* SC 5314 e ATCC 18804, além de 27 cepas de *Candida albicans* isoladas de lesões de candidose obtidos em estudo de Crastechini et al. (2009). Os micro-organismos foram semeados em ágar Sabouraud Dextrose e incubados por 24 horas a 37 °C. Subsequentemente, os inóculos foram preparados de acordo com o item 3.3. A técnica da microdiluição em caldo (CLSI, 2008) foi utilizada para os ensaios. As substâncias a serem testadas foram resuspensas no meio de cultura RPMI (já descrito no item 3.3), todas na concentração de 10 mg/ml. Em seguida, 100 µl destes foram colocados na primeira coluna de placas de microtitulação com 96 poços.

Para as diluições, 50 µl das substâncias na concentração inicial foram pipetadas nas colunas subsequentes que continham 50 µl de RPMI. As diluições seguiram por base dois. Ao final, foram obtidas concentrações entre 5 mg/ml até 0,04 mg/ml. Alíquotas de 50 µl dos inóculos foram pipetadas nos poços, com excessão do controle do meio de cultura. A CIM e a CFM foi avaliada após 24 horas de incubação. Esta avaliação foi realizada através de subculturas de 3 µl das diluições e dos controles positivos em placas contendo Agar BHI, que foram incubado por 24 horas a 37 °C. A CIM correspondeu à concentração que levou a 50 %

de inibição em relação ao controle e a CFM a concentração que totalmente inibiu o crescimento do micro-organismo.

A substância fenônica de melhor ação contra *C. albicans* foi o AG. Sendo assim, nas demais etapas foram utilizados apenas FE e AG.

#### **4.6 Avaliação da atividade da FE e AG sobre fatores de virulência de *Candida albicans***

##### **4.6.1 Determinação da concentração de erradicação do biofilme (CEB) mono-espécie de *Candida albicans***

A metodologia utilizada para esta fase do estudo foi baseada em Cheng et al. (2011), com algumas modificações. Nesta etapa, foram utilizadas as cepas de *C. albicans* ATCC 18804 e SC 5314 além de 3 isolados clínicos que melhor formaram biofilme. Os biofilmes de 24 e 48 horas foram formados em corpos de prova de poliestireno com 50 mm<sup>2</sup> esterilizados por radiação UV por 30 minutos. Os inóculos foram preparados como previamente descrito (item 3.5.1) modificando apenas o comprimento de onda (520 nm), obtendo-se então um inóculo contendo 10<sup>7</sup> células/ml. Em seguida, alíquotas de 20 µl dos inóculos foram adicionadas em 200 µl de RPMI (item 3.5.1) adicionado de 2 % de glicose, em placas de 96 poços e os corpos de prova foram adicionados a esta mistura. As placas foram incubadas por 120 minutos a 37 °C sob agitação de 80 rpm para a fase de pré-aderência.

Em seguida, os corpos de prova foram lavados com NaCl 0,9 % e foi adicionado novamente 200 µl de RPMI. Para o biofilme de 48 horas, este procedimento foi realizado novamente após 24 horas de incubação. Três corpos de prova foram incubados também por 24 e 48



horas nas mesmas condições, porém sem adição do inóculo, como controle de esterilidade dos corpos de prova.

Os biofilmes foram expostos a concentrações 2 e 4 vezes CIM de FE e AG por 5 minutos em temperatura ambiente. Após este contato, os corpos de prova foram novamente lavados em solução fisiológica (NaCl 0,9 %) e transferidas para tubos contendo 1 ml de solução fisiológica. Para a recuperação do biofilme, os tubos foram agitados por 60 segundos em vórtex e depois sonicados (2 pulsos de 15 segundos com vinte segundos de intervalo, amplitude 40, 15 W no gelo). A suspensão resultante foi diluída em série (até  $10^{-4}$ ) e inoculada em ágar Sabouraud e em seguida incubadas por 48 horas, a 37 °C, para obtenção dos valores de unidades formadoras de colônias (UFC/espécime). Os experimentos foram realizados em triplicada em 3 dias diferentes.

#### 4.6.2 Ação sobre a formação de biofilme

No intuito de verificar a influência de FE e AG na formação do biofilme de *C. albicans*, foi utilizada a mesma metodologia do item 4.5.1. Porém os biofilmes foram formados no meio de cultura contendo FE e AG diluídas no meio de cultura em 1/2 CIM.

#### 4.6.3 Ação sobre a produção de proteinase e fosfolipase

As amostras de *C. albicans* citadas no item 3.5.1 foram avaliadas em exposição em solução salina tamponada com fosfato (PBS - controle) e após exposição das células fúngicas à 1/2 CIM da FE ou AG. Para tal, as suspensões contendo  $10^7$  células/ml das amostras foram

preparadas conforme previamente descrito (item 3.4.3) e diluídas 1/10 em solução aquosa das substâncias nas concentrações desejadas. As amostras foram incubadas por 1 hora a 37 °C sob rotação de 80 rpm. O tempo de exposição foi baseado em Hammer et al. (2000).

A análise da produção de fosfolipase foi avaliada de acordo com metodologia proposta por Polak (1992), com modificações. O meio base foi preparado utilizando-se 20 g dextrose, 10 g de peptona, 5 g de extrato de levedura, 58,5 g de cloreto de sódio, 0,55 g de cloreto de cálcio e 20 g de ágar em 840 ml de água destilada. O meio base foi então autoclavado e em seguida mantido em banho-maria a 55 °C. Posteriormente, foi adicionado 160 ml de emulsão de gema de ovo a 50%. Após a completa solidificação do meio, alíquotas de 2 µl das suspensões padronizadas foram pipetadas sobre a superfície do meio. Cada isolado foi avaliado em triplicata em três experimentos diferentes. As placas foram incubadas a 37 °C por 4 dias. Os halos de precipitação e o diâmetro das colônias foram mensurados.

A produção de proteinase foi avaliada de acordo com Aoki et al. (1990). O meio consiste em ágar contendo soro albumina bovina (BSA). Uma solução contendo 0,04 g MgSO<sub>4</sub>, 0,5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g NaCl, 0,2 g extrato de levedura, 4 g glicose e 0,5 g BSA (albumina sérica bovina) foi preparada e o pH ajustado a 3,5 com 1 N HCl. Essa solução foi esterilizada por filtração e 60 ml foram adicionados a 140 ml de ágar. O inóculo foi preparado como descrito anteriormente para o teste de produção de fosfolipase. Todas as cepas foram avaliadas em triplicata em as placas foram incubadas a 37 °C por 7 dias.

A produção de fosfolipase e proteinase foram expressas como valores de Pz, calculada pela razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro da colônia mais a zona de precipitação formada. Os Pzs foram transformados em scores, onde a atividade enzimática foi negativa quando o score foi 1, positiva quando o score foi 2 e fortemente positiva

quando o score foi 3. Os experimentos foram realizados em triplicada em 3 dias diferentes.

#### 4.6.4 Ação sobre a morfogênese de *C. albicans* (transição levedura-hifa)

Os ensaios foram realizados de acordo com Ohta et al. (2007) e Chevalier et al. (2012) com as amostras padrão. Para tal, as suspensões foram preparadas na concentração de  $2,5 \times 10^5$  blastoconídeos por ml, em caldo Sabouraud dextrose (pH 5,8) e RPMI. A FE e substância isolada foram avaliadas em caldo RPMI e caldo Sabouraud dextrose na concentração de 1/2 CIM. Como controle negativo foi utilizado somente RPMI e caldo Sabouraud. Um volume de 1 ml dos preparos foram transferidos para placas de 24 poços e incubados a 37 °C. Após incubação por 0, 4 e 24 horas foram realizadas contagens de hifas, incluindo tanto as hifas verdadeiras e pseudohifas. Os experimentos foram realizados em triplicada em 3 dias diferentes.

#### 4.6.5 Ação sobre a aderência de *Candida albicans* às células epiteliais bucais

A aderência *in vitro* de *C. albicans* em células epiteliais foi realizada como previamente descrito (Macura, Tondrya, 1989; Wellmer, Bernhardt, 1997). As amostras padrão de *C. albicans* (ATCC 18804 e SC 5314) foram semeadas em ágar Sabouraud Dextrose e incubadas a 37 °C por 24 horas. Em seguida, as células foram centrifugadas (10.000 xg por 15 minutos) e lavadas três vezes em 15 ml de PBS. Uma suspensão contendo  $10^6$  células/ml foi obtida conforme previamente descrito (item

3.4.1). As células de *C. albicans* foram expostas a 1/2 CIM da FE ou substância isolada por 1 minuto.

As células epiteliais foram obtidas de indivíduos saudáveis, após assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido, por raspagem da mucosa jugal utilizando espátulas de madeira estéreis. As células foram centrifugadas (10.000 xg; 30 s) e lavadas três vezes com PBS. Uma suspensão contendo  $10^5$  células/ml foi obtida por contagem em câmara de Neubauer. As suspensões de *C. albicans* e das células epiteliais foram misturadas e incubadas a 37 °C por 1 hora. Foi incluído controle negativo sem tratamento. As células de *C. albicans* que não aderirem às células epiteliais foram eliminadas usando membranas de 12 µm. Os filtros foram lavados com PBS e o conteúdo desta lavagem foi colorido com cristal violeta e o número de leveduras aderidas em 25 células epiteliais foi quantificado. Os experimentos foram realizados em triplicada em 3 dias diferentes.

#### 4.6.6 Ação sobre a expressão dos genes SAPs, HWP1 e ALS

Foi avaliada a expressão dos genes ligados a alguns fatores de virulência de *Candida* spp. como os da família *secreted aspartyl proteases* (SAP) 2, 4 e 6 relacionados à secreção de enzimas proteolíticas, o gene 3 da família *agglutinin-like sequence* (ALS 3) referente a adesão nas células do hospedeiro e finalmente o gene *hyphal wall protein 1* (HWP1) relacionado a formação de hifas, frente a concentrações sub-inibitórias de ácido gálico, FE, fluconazol (Controle positivo) e AG ou FE junto com fluconazol. O protocolo foi baseado no trabalho de Watamoto et al. (2011).

#### 4.6.6.1 Formação e tratamento dos biofilmes

Primeiramente, valores de CIMs foram determinados de acordo com o protocolo do CLSI (2008), todavia, utilizando como meio de cultura o caldo YNB com 100 mM de glicose, as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) das cepas de *C. albicans* ATCC 18804 e SC 5314 frente a FE, ácido gálico e ao fluconazol (controle positivo). Subsequentemente, os biofilmes de 24 horas das cepas de *C. albicans* ATCC 18804 e SC 5314 foram formados. Para tal, as cepas foram cultivadas em meio Sabouraud dextrose a 37 °C durante 24 horas. Em seguida, uma alíquota das leveduras foi inoculada em tubos contendo 20 ml do meio de cultura yeast nitrogen (YNB) suplementado com 50 mM de glicose. Os tubos foram incubados sobre agitação de 75 rpm *overnight*. As células foram centrifugadas a 4 °C por 3 minutos a 5000 rpm.

O precipitado de células foi ressuscitado em 20 ml de salina tamponada com fosfato (PBS; pH 7,2) e novamente centrifugado nas mesmas condições. Este procedimento foi repetido 2 vezes. Sequencialmente, as células foram ressuscitadas em YNB suplementado com 100 mM de glicose, de modo a atingir uma densidade óptica de 0,380 a 520 nm ( $1 \times 10^7$  células / ml). Para a fase de pré-aderência do biofilme, 100 µl da suspensão foi pipetada em cerca de 20 poços de uma placa de microtitulação de 96 poços que em seguida foi incubada durante 90 minutos a 37 °C em um agitador a 75 rpm. Depois, o meio foi aspirado e os poços foram lavados 2 vezes com 100 µl de PBS para remover as células fracamente aderidas.

Os biofilmes prontos foram expostos a 200 µl de soluções a 1/2 CIM previamente estabelecidas de FE, ácido gálico, fluconazol bem como ácido gálico ou FE mais fluconazol diluídas em YNB com 50 mM de glicose por 24 horas 37 °C em um agitador a 75 rpm. Na sequência o

sobrenadante foi aspirado e os biofilmes foram lavados 2 vezes com 100 µl de PBS.

#### 4.6.6.2 Extração do RNA

Cerca de 200 µl de Trizol<sup>®</sup> foi pipetado em 5 dos 20 poços dos biofilmes já tratados e lavados totalizando 1 ml. Os biofilmes dos poços contendo Trizol<sup>®</sup> foram desprendidos mecanicamente do fundo dos poços com auxílio de uma ponteira e esta solução de Trizol<sup>®</sup> com o biofilme desprendido foi transferida para outros 5 poços até totalizar a extração do biofilme dos 20 poços. Os cerca de 1 ml de Trizol<sup>®</sup> com os biofilmes foram transferidos para um microtubo que foi deixado em temperatura ambiente por 5 minutos. Foi adicionado então 0,2 ml de clorofórmio e os tubos foram manualmente e vigorosamente agitados por 15 segundos, seguida de incubação a temperatura ambiente por 3 minutos. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm durante 20 minutos a 4 °C.

Separou-se então a mistura em uma fase inferior constituída de fenol-clorofórmio (coloração vermelha), uma interfase de cor esbranquiçada e uma fase superior aquosa incolor onde se localiza o RNA. Cuidadosamente, apenas a camada aquosa superior foi transferida para um novo microtubo onde 0,5 ml de isopropanol foi adicionado para a precipitação do RNA, sendo esta mistura incubada por 20 minutos em temperatura ambiente. Os tubos foram então centrifugados a 3.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado tomando-se cuidado para não dissolver o *pellet* de RNA no fundo do tubo e sequencialmente foi adicionado 1 ml de etanol 75 % gelado (diluído em água livre de nuclease).

Os tubos foram invertidos por algumas vezes e então novamente centrifugados a 7.500g durante 5 minutos a 4 °C. Logo em seguida, o etanol foi também cuidadosamente removido e os tubos ficaram abertos em temperatura ambiente durante 10 minutos para total secagem. Após a secagem, o RNA foi dissolvido em cerca de 15 a 20 µl de água livre de nuclease e armazenado em freezer -80 °C.

#### 4.6.6.3 Síntese de DNA complementar (cDNA)

A síntese de cDNA foi feita por transcriptase reversa utilizando o protocolo do kit Promega (cat num: M1701). Inicialmente, o RNA extraído foi quantificado em Nanodrop®. O RNA foi diluído até a concentração final de 1 µg. O mix para a primeira etapa da síntese do cDNA conteve: 1µg de RNA, 1µl de dNTP (10mM), 1µl OligodT (50mM) e adicionado de água ultrapura até o volume final de 14,5 µl. O volume de água irá depender da concentração de RNA extraído, todavia o volume final do mix deve ter no máximo 14,5 µl. O mix foi levado para um termociclador e realizado um ciclo de 5 minutos a 65 °C seguido de um ciclo a 4 °C por 2 minutos. Em seguida, outro mix contendo 4 µl do tampão M-MLV 5x, 0,5 µl de inibidor de RNase e 1 µl de M-MLV transcriptase reversa foi adicionado ao tubo. Em seguida realizou-se no termociclador um ciclo de 50 °C por 60 minutos seguido de 85 °C por 5 minutos sendo este resfriado para 4 °C. O cDNA sintetizado foi armazenado em freezer -20 °C.

#### 4.6.6.4 PCR em tempo real (RT PCR)

O protocolo utilizou o kit KAPA SYBR® FAST qPCR. Os genes estudados foram SAP2, SAP4, SAP6, ALS3 e HWP1. Os *primers* foram sintetizados de acordo com as sequências disponíveis na literatura. O gene de referência (*housekeeping gene*) foi o ACT1. O cDNA foi diluído de 3-10 vezes (normalmente 5 vezes é o suficiente). Então, preparou-se o mix contendo 0,4 µl de Primer F (500nM/µl), 0,4 µl de Primer R (500nM/µl), 0,4 µl de Enzima Rox, 10 µl de Sybr Green, 1 µl de cDNA e 7,8 de água livre de nuclease. O mix foi pipetado em placas de microtitulação de 96 poços que foram seladas com um adesivo ótico e centrifugadas de 2 a 5 minutos a 2000 rpm a 4 °C. Finalmente, as placas foram colocadas no aparelho StepOne® (Applied Biosystems) programado de acordo com o quadro 1.

Quadro 1- Ciclos para realização de PCR em tempo real (RT PCR)

Passo	Temperatura	Duração
1	50 °C	2 minutos
2	95 °C	10 minutos
3	95 °C	15 segundos
4	60 °C	1 minuto
A partir do passo 3	39 ciclos adicionais	



## 4.7 Obtenção e caracterização química do encapsulado

### 4.7.1 Diagrama de solubilidade

Esta etapa consistiu em avaliar se a complexação da molécula com a ciclodextrina aumenta sua solubilidade em água. Realizou-se conforme metodologias descritas na literatura (Tewes et al., 2008; Yang et al., 2009; Balducci et al., 2013; Miletic et al., 2013; Rudrangi et al., 2015). A Beta-Ciclodextrina ( $\beta$ -CD) e a 2-Hidroxiopropil-Beta-Ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD) foram selecionadas.

Diferentes concentrações de  $\beta$ -CD ou HP- $\beta$ -CD (0-16 mM ou 0-144 mM respectivamente) na presença de ácido gálico em excesso (20 mg/ml) foram misturadas em água e agitadas num agitador magnético à temperatura ambiente durante 72 horas. Logo após, todos os preparados foram filtrados através de um filtro de membrana de 0,45  $\mu$ m, diluídas adequadamente e analisadas espectrofotometricamente para o teor total de ácido gálico dissolvido através de análise em UV a 260 nm (espectrofotômetro Biotek® Synergy™ HT). O diagrama de solubilidade de fase foi construído traçando concentrações de ácido gálico dissolvido em função da concentração de ciclodextrina. A eficiência de complexação (CE) foi calculada a partir da inclinação da reta (*slope*) do diagrama de fases descrito na equação descrita no trabalho de Loftsson et al. (2005).

$$CE = \frac{\text{Slope}}{1-\text{Slope}}$$

A partir da equação 1, a proporção entre o ácido gálico as ciclodextrinas (D: CD) foi obtido de acordo com outra equação descrita em Loftsson et al. (2007).

$$D: CD = 1: (1 + 1/CE)$$

#### 4.7.2 Secagem por atomização dos complexos de inclusão e detecção do percentual de ácido gálico

Efetuuou-se a secagem da suspensão por *spray dryer* (Büchi Mini Spray Drying B290), em colaboração com o Laboratório de Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos do Instituto de Biologia da Unicamp. Utilizou-se os seguintes parâmetros: temperatura de entrada igual a 120 °C, temperatura de saída igual a 70 °C, aspiração igual a 80 %, *pump* igual a 18 % e *nozzle cleaner* igual a 0.

Os complexos de inclusão de ácido gálico/CDs ou FE/CDs foram obtidos na proporção de 1:1 molar. Para o preparo do ácido gálico, HP- $\beta$ -CD (5 g) foi disperso em 20 ml de água para se obter uma solução, enquanto que o ácido gálico (0,616 g) foi dissolvido em 6 ml de metanol. A solução metanólica foi adicionada lentamente à solução de água/HP- $\beta$ -CD. Para o preparo do FE, considerou-se que esta contém a concentração de 15 % de ácido gálico (dados demonstrados no relatório anterior). Sendo assim HP- $\beta$ -CD (0,5 g) foi disperso em 2 ml de água para se obter uma solução, enquanto que a FE (0,41 g) foi dissolvido em 0,6 ml de metanol. As soluções finais foram bombeada para dentro do *spray-dryer*.

Após secagem por atomização, detectou-se a porcentagem de ácido gálico presente nas formulações Ácido gálico/ HP- $\beta$ -CD ou Fração Enriquecida/ HP- $\beta$ -CD por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Para tanto, pesou-se amostra das formulações, reconstitui-se em água e manteve-se em agitação por 4 e 24 horas a fim de garantir um equilíbrio entre ácido gálico ou FE e HP- $\beta$ -CD. Determinou-se a porcentagem de ácido gálico (% AG) presente na formulação segundo da seguinte equação:

$$\%AG = (C_{AG} \times V_{\text{água}} / m_{\text{formulação}}) \times 100$$

Nesta equação  $C_{AG}$  é a concentração de ácido gálico determinada por CLAE,  $V_{\text{água}}$  é o volume de água utilizado para reconstituir a formulação e  $m_{\text{formulação}}$  é a massa total de formulação utilizada.

#### 4.7.3 Calorimetria diferencial de varredura

Realizou-se a calorimetria diferencial de varredura em um equipamento DSC 2910 TA Instruments em colaboração com a Central Analítica do Instituto de Química da Unicamp. Tal metodologia fornece dados indicativos da formação do complexo de inclusão. Amostras de 10mg dos complexos de inclusão secos por atomização de Ácido gálico/ HP- $\beta$ -CD ou Fração Enriquecida/ HP- $\beta$ -CD, das misturas físicas (Ácido gálico/ HP- $\beta$ -CD ou Fração Enriquecida/ HP- $\beta$ -CD desidratados na mesma proporção) e de Ácido gálico, FE e HP- $\beta$ -CD separadamente foram aquecidas a uma velocidade de 10 °C/minuto em uma faixa de 25 °C a 300 °C em atmosfera inerte.

#### 4.7.4 Microscopia eletrônica de varredura

As misturas físicas de HP- $\beta$ -CD/ ácido gálico ou FE bem como os encapsulados HP- $\beta$ -CD /ácido gálico ou FE foram fixadas, com o auxílio de fita de carbono, em *stubs* de alumínio os quais foram submetidos à metalização em ouro por 180 segundos. As amostras foram

avaliadas em microscópio eletrônico de varredura afim de verificar possíveis mudanças na morfologia das substâncias isoladas e em mistura física com os complexos de inclusão formados uma vez que essas alterações morfológicas também é indicativo da complexação entre ácido gálico ou FE em HP- $\beta$ -CD.

#### **4.8 Avaliação da efetividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* e citotoxicidade dos encapsulados**

##### 4.8.1 Avaliação da efetividade antifúngica *in vitro*

Os valores de CIM e CFM dos encapsulados de ácido gálico e FE com HP- $\beta$ -CD para as amostras padrão de *C. albicans* ATCC 18804 e SC 5314 foram determinados utilizando protocolo anteriormente citado (item 3.4.2). Para o tratamento de biofilmes seguiu-se o protocolo conforme o item 3.4.3, com os encapsulados na concentração 4 vezes CIM.

##### 4.8.2 Avaliação da efetividade *in vivo* em modelo experimental de candidose eritematosa em ratos

O encapsulado de ácido gálico foi utilizado para os ensaios *in vivo* por meio de modelo em ratos de acordo com Nett et al. (2010) e Okada et al. (2013) com algumas modificações.

Foram utilizados 15 ratos (*Rattus norvegicus* Wistar), machos com peso aproximado de 350 g (aproximadamente três meses de idade). Os ratos foram divididos nos seguintes grupos: **Grupos**

**encapsulado 1 (n=5):** tratamento com ácido gálico encapsulado encapsulados na concentração de quatro vezes a CIM; **Grupo controle (n=5):** tratamento com solução fisiológica NaCl 0,9 %; **Grupo nistatina (n=5):** tratamento com solução de nistatina (100.000 UI/ml).

#### 4.8.2.1 Inoculação

Foi realizada terapia antibiótica com aztreonam (50 mg/kg por via oral) 48 horas antes da inoculação para reduzir a colonização local por bactérias entéricas, comum aos roedores devido à coprofagia (ingestão de fezes). Depois da antibioticoterapia, os animais foram imunossuprimidos com prednisolona (100 mg/Kg peso corporal). A imunossupressão foi mantida até antes da eutanásia, sempre realizada com intervalo de 24 horas totalizando 5 imunossupressões.

Após 24 horas da primeira imunossupressão, suspensões de *C. albicans* ATCC 18804 ( $10^6$  células/ml) foram inoculadas no palato dos animais com auxílio de um swab esterilizado durante 3 minutos. Outra inoculação foi realizada 24 após a primeira. Para a inoculação, os animais foram anestesiados com solução aquosa a 2 % de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3 tiazina associada à ketamina base, na proporção de 1:0,5 ml/100 g de peso do animal. Os animais foram mantidos em condições usuais de biotério com alimentação e água *ad libitum*.

Os animais foram examinados 24 horas antes do tratamento para a pesquisa de sinais de inflamação ou secreção purulenta. Para o tratamento, todos os grupos receberam 100 µl da substância-teste, duas vezes ao dia (9 horas e 15 horas) durante 4 dias. Após os respectivos tratamentos os ratos foram eutanasiados por dose excessiva do anestésico previamente descrito.

#### 4.8.2.2 Análise histopatológica e quantificação de hifas

Os palatos foram removidos para exame histopatológico, sendo estes materiais conservados em solução de formol a 10 % por 48 horas, incluídos em blocos de parafina para realização de cortes em micrótomo com espessura de 5  $\mu\text{m}$ . Os foram corados pelas técnicas de Hematoxilina e Eosina (HE) e Ácido periódico de Schiff (PAS).

Foram selecionadas 3 lâminas com coloração de HE e analisou-se o grau de inflamação da mucosa e seus aspectos, como células inflamatórias presentes e possíveis alterações na camada epitelial. Nas lâminas de PAS realizou-se a contagem do número de hifas. Para tal, foram selecionados dois cortes histológicos aleatoriamente e analisados a partir de cada animal. Em cada corte histológico, 21 campos histológicos foram analisados no sentido ântero-posterior em 42 campos histológicos.

A presença de levedura e hifas foi quantificado de acordo com a metodologia de Junqueira et al. (2005) atribuindo os seguintes *scores* para campos histológicos: 1, 1 a 5 leveduras / hifas; 2, de 6 a 15 de leveduras / hifas; 3, de 16 a 50 leveduras / hifas; e 4, mais de 50 leveduras / hifas. A mediana das pontuações obtidas a partir dos 42 campos histológicos foi determinada por animal.

#### 4.8.3 Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

As células ds linhagem Vero (fibroblasto-like de rins do macaco-verde) foram cultivadas a 37 °C e atmosfera de 95 % de ar e 5 % de CO<sub>2</sub> em meio de cultura de células Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 5 % de soro fetal de bovino

inativado, 100 UI/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina. Suspensões celulares em densidade de  $6 \times 10^5$  / poço foram semadas em microplaca de 96 poços, seguindo-se incubação por 24 horas.

Após esse período, o meio de cultura celular foi removido e soluções de ácido gálico ou fração enriquecida em suas formas livres ou encapsuladas preparadas em meio de cultura celular foram adicionadas. Utilizou-se meio de cultura celular como controle negativo e gluconato de clorexidina a 1,2 mg/ml dissolvido em meio de cultura celular como controle positivo. As células com as soluções tratamento foram incubadas durante 24 horas.

Em seguida, o meio contendo as soluções-teste foi removido e adicionou-se um volume de 100 µl de 0,5 mg/ml de MTT e incubou-se a placa por mais 4 horas. O ensaio colorimétrico com MTT avalia a capacidade das células viáveis de converter MTT em cristais de formazan (Riss et al., 2004), que apresentam uma coloração púrpura quando solubilizados em certos solventes. Mediram-se os valores de absorvância utilizando espectrofotômetro (Biotek Synergy™ HT, Winooski, VT, EUA) a 570 nm como descrito por Mosmann (1983), com ligeiras modificações. Após 4 horas, a suspensão formada foi removida e adicionou-se DMSO a fim de dissolver os cristais de formazan. Realizaram-se os experimentos duas ou três vezes em triplicata. Os percentuais de viabilidade celular foram classificados como não citotóxico (>90% de viabilidade celular), levemente citotóxico (60-90% de viabilidade celular) moderadamente citotóxico (59-30% de viabilidade celular) e severamente citotóxico (29-0% de viabilidade celular) sendo o controle negativo considerado como 100 % de viabilidade celular (Sletten, Dahl, 1999).

#### **4.9 Análise estatística**

Os dados obtidos nos ensaios foram analisados estatisticamente com auxílio do programa GraphPad Prism versão 6.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Foi realizado um teste de normalidade da distribuição para empregar o teste mais adequado. O nível de significância foi de 5%.



## **5 RESULTADOS**

### **5.1 *Screening* inicial da atividade antifúngica**

Os resultados demonstraram que as duas frações mais promissoras foram a acetônica e a hidroalcoólica sendo estas também as que deram melhor rendimento (2,6 e 0,13 gramas respectivamente). As frações hexânica e diclorometânica não apresentaram atividade antifúngica contra *C. albicans*. Os halos de inibição para ambas variaram entre 9 e 11 mm.

### **5.2 Caracterização do perfil químico da fração enriquecida das folhas de *B. tomentosa***

A análise por ESI-MS (Figura 2) mostrou a presença dos compostos fenólicos utilizados no presente estudo: ácido gálico, corilagina, vitexina e kaempferol, (-) epicatequina e ácido elágico.

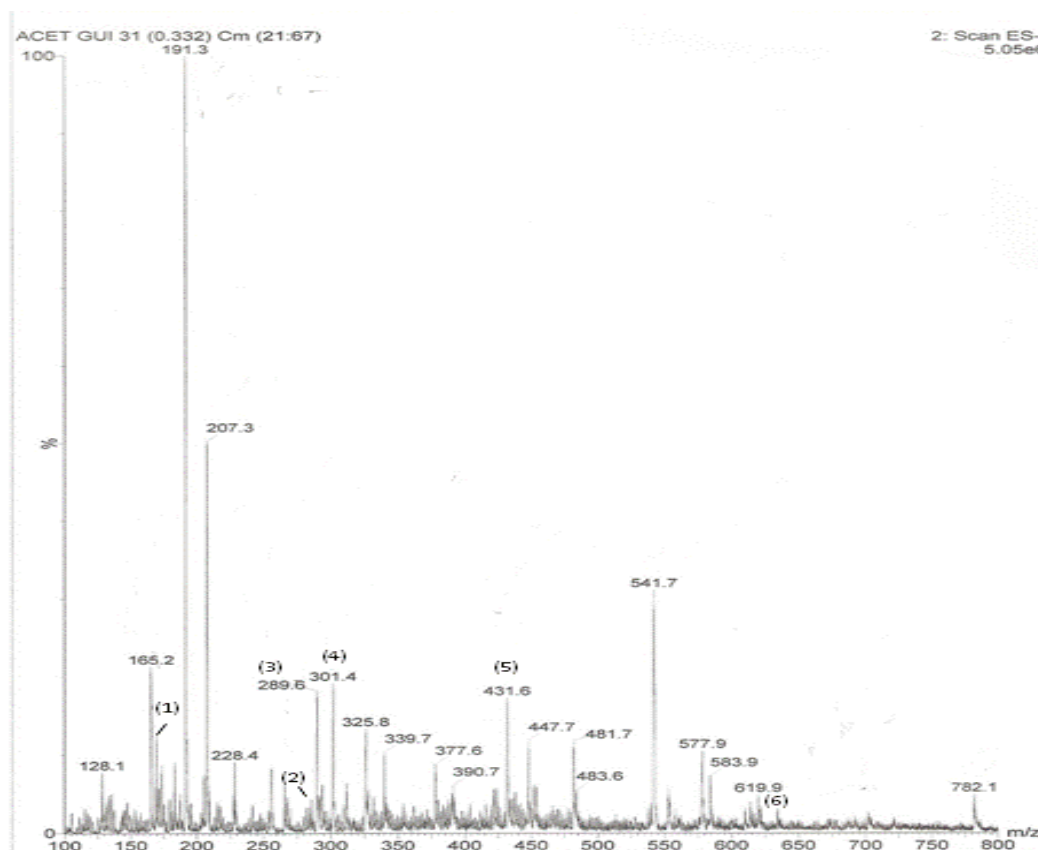


Figura 2- Espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI-MS) da fração acetônica obtida de um extrato aquoso das folhas de *B. tomentosa*. (1)- ácido gálico; (2) kaempferol; (3)- (-) epicatequina; (4)- ácido elágico; (5)- vitexina; (6)- corilagina.

### 5.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) da fração enriquecida (FE) de *Buchenavia tomentosa* e substâncias isoladas

Dentre as moléculas fenólicas avaliadas, apenas o ácido gálico apresentou atividade contra *C. albicans*. Desta forma, o ácido gálico foi selecionado para os estudos subsequentes. As CIMs para todas as cepas de *C. albicans* variaram entre 5,0 e 0,625 mg/ml para o ácido gálico e 2,5 e 0,019 mg/ml para FE. A CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> para o ácido gálico foram respectivamente 2,5 e 5,0 mg/ml e para FE foi 0,625 mg/ml para ambos. Não houve valores de CFMs, pois o efeito das substâncias foi

fungistático. Foram consideradas as CIMs para os demais estudos 2,5 mg/ml para FE e 5 mg/ml para AG.

#### **5.4 Avaliação sobre fatores de virulência de *Candida albicans***

Para o tratamento do biofilme, foi selecionado o encapsulado do ácido gálico/ HP- $\beta$ -CD, pois FE não encapsulado apresentou boa atividade anti-biofilme além de boa solubilidade em água. O grupo 4 vezes CIM de ácido gálico foi encapsulado em HP- $\beta$ -CD, uma vez que esta concentração (20 mg/ml) não é solúvel em água. Observou-se redução estatisticamente significativa entre os grupos tratados com FE e ácido gálico em todas as concentrações estudadas, com exceção do grupo tratado com ácido gálico 2 vezes a CIM no biofilme de 24 horas ( $p=0,09$ ).

Nos biofilmes de 24 horas tratados com FE nas concentrações de 2 e 4 vezes as CIM os resultados mostraram que houve significativa diminuição das contagens de UFC/amostra em relação ao controle não tratado ( $p=0,0001$  e  $0,0004$ , respectivamente). O mesmo efeito foi observado para o grupo ácido gálico encapsulado ( $p=0,002$ ). Para os biofilmes de 48 horas, as análises também confirmaram significativa redução de UFC/amostra em relação ao controle não tratado ( $p < 0,0001$ ) nos tratamentos com FE e ácido gálico.

O encapsulado do ácido gálico (4 vezes CIM) foi mais efetivo que não encapsulado (2 vezes CIM) para os biofilmes de 24 ( $p=0,045$ ) e 48 horas ( $p < 0,0001$ ) sendo que em 48 horas não houve diferença ácido gálico encapsulado e a anfotericina B ( $p=0,08$ ).

Já em relação a formação do biofilme, observou-se significativa redução na formação do biofilme de *C. albicans* em 24 e 48 horas para FE ( $p=0,005$  e  $< 0,0001$ ) e ácido gálico ( $p=0,001$  e  $< 0,0001$ ).

Entre os grupos, apenas em 48 horas o ácido gálico se apresentou mais efetivo do que FE ( $p= 0,04$ ). Os resultados estão ilustrados nas figuras 3 e 4.

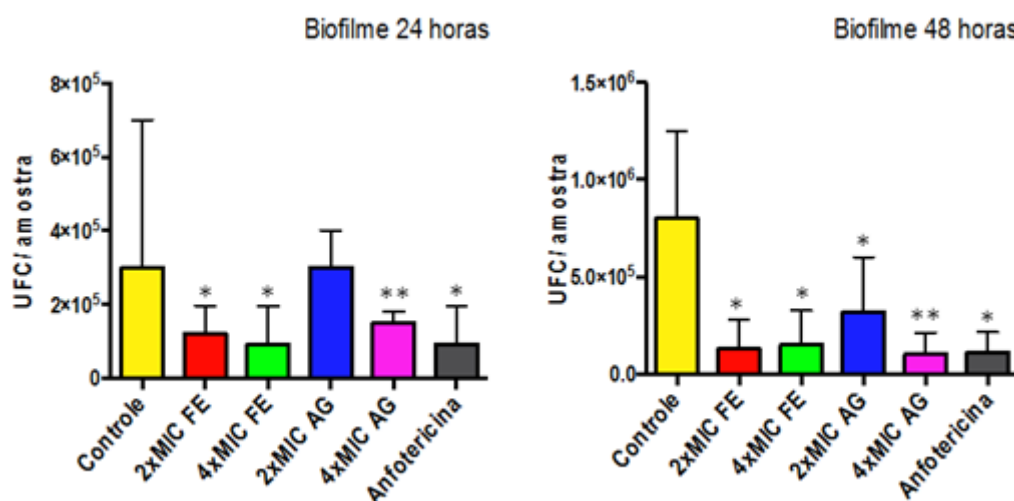


Figura 3 - Influência da fração enriquecida em fenólicos (FE) e do ácido gálico (AG) na erradicação do biofilme de *Candida albicans*. 2X MIC: duas vezes a concentração inibitória mínima; 4X MIC: quatro vezes a concentração inibitória mínima; \* estatisticamente significativo em relação ao controle; \*\* estatisticamente significativo em relação ao controle e a 2X MIC AG; Wilcoxon matched-pairs signed rank test.

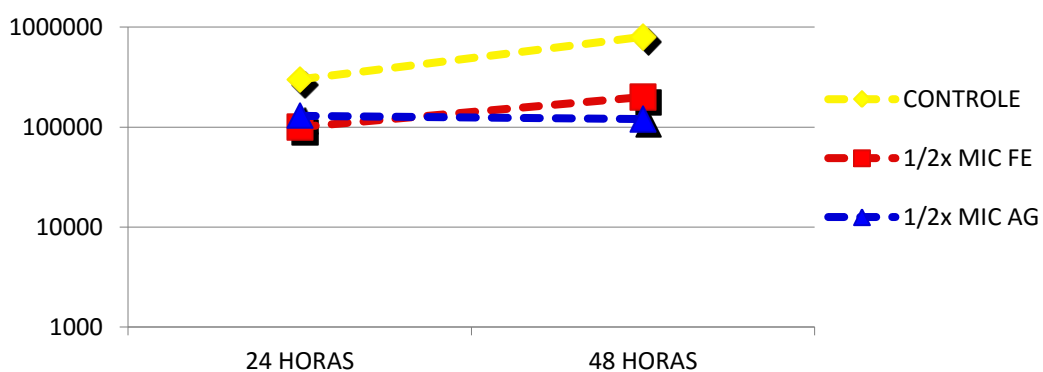


Figura 4 - Influência da fração enriquecida em fenólicos (FE) e do ácido gálico (AG) na formação do biofilme de *Candida albicans*. 1/2 MIC: 50 % da concentração inibitória mínima; Wilcoxon matched-pairs signed rank test.

Com relação a produção de exoenzimas, todas as amostras avaliadas foram positivas para a produção de fosfolipase e

proteínase. Não foi observada redução na produção das exoenzimas após tratamentos com FE e ácido gálico (Figura 5).

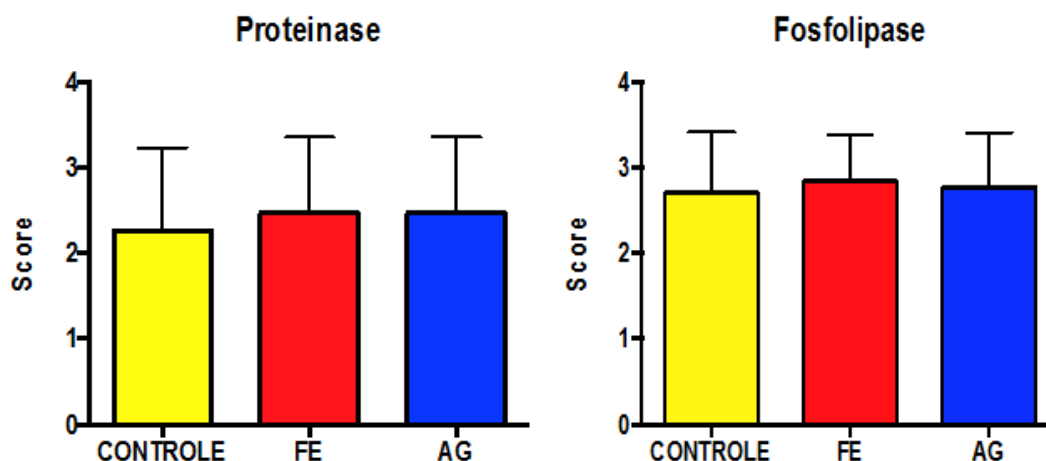


Figura 5 - Influência da fração enriquecida em fenólicos (FE) e do ácido gálico (AG) em 50 % da concentração inibitória mínima (1/2 MIC) sobre a produção das exoenzimas proteínase e fosfolipase em *Candida albicans*. Dunn's multiple comparisons test.

Os tratamentos tanto com FE quanto ácido gálico foram eficazes na redução da formação de hifas de *C. albicans* em relação ao controle não tratado (Figura 6). Em relação ao controle sem tratamento, os grupos tratados com FE para as cepas ATCC 18804 apresentaram para os períodos de 4 e 24 horas diminuição nas contagens de hifas ( $p=0,009$  e  $0,01$ ). Redução significativa também foi observada para a cepa SC 5314 ( $p < 0,0001$  para ambos os períodos avaliados).

No tratamento com ácido gálico, também houve redução significativa da formação de hifas pela cepa SC 5314 nos dois períodos estudados ( $p=0,003$  e  $0,0005$  respectivamente). Todavia, para a cepa ATCC 18804, a diminuição significativa das hifas foi observada apenas em 24 horas ( $p=0,02$ ).

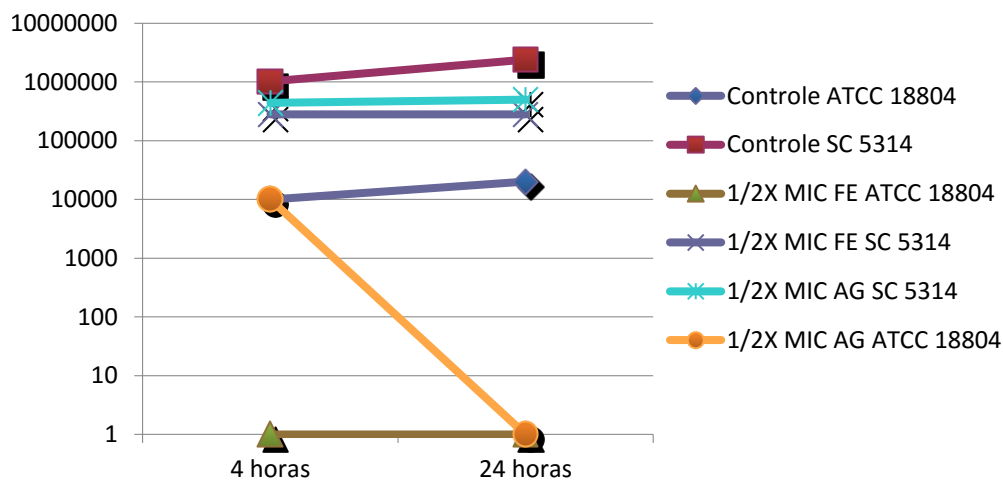


Figura 6 - Influência da fração enriquecida em fenólicos (FE) e do ácido gálico (AG) na produção de hifas em *Candida albicans* ATCC 18804 e SC 5314; 1/2 MIC- 50 % da concentração inibitória mínima; Mann Whitney test.

A figura 7 mostra que os tratamentos, tanto com FE quanto ácido gálico levaram à redução da aderência das cepas ATCC 18804 e SC 5314 ( $p < 0,0001$ ) de *C. albicans* nas células do epitélio bucal. A aderência da cepa 18804 foi menor após o tratamento com FE em comparação ao ácido gálico ( $p = 0,01$ ).

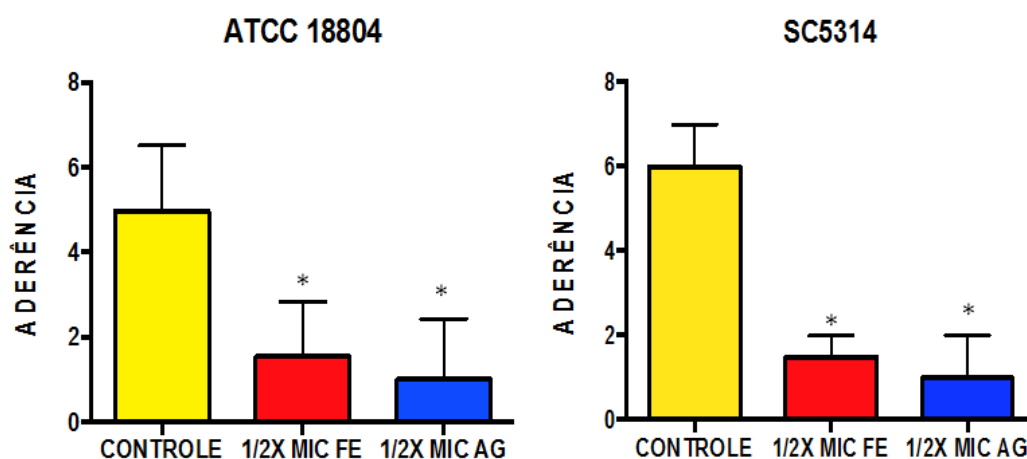


Figura 7- Influência da fração enriquecida em fenólicos (FE) e do ácido gálico (AG) na adesão de *Candida albicans* ATCC 18804 e SC 5314 às células epiteliais bucais; \* estatisticamente significativa em relação ao controle; 1/2 MIC: 50 % da concentração inibitória mínima; Mann Whitney test.

Com relação aos genes da família SAP, observou-se que houve diminuição na expressão de SAP 2 nos biofilmes tratados com ácido gálico ( $p= 0,01$ ) e aumento na expressão de SAP 6 ( $p= 0,04$ ), em relação ao grupo não tratado.

Para FE, houve aumento na expressão de SAP 2 ( $p= 0,01$ ). A diminuição da expressão de SAP 4 com relação ao controle não tratado foi observada no grupo fluconazol ( $p= 0,04$ ). Na associação do fluconazol com FE, a expressão de SAP 4 foi reduzida em comparação ao grupo não tratado ( $p= 0,001$ ) e tratado com fluconazol ( $p= 0,005$ ). Para SAP 6, a diminuição da expressão em relação ao controle não tratado foi observada no grupo tratado com fluconazol ( $p= 0,001$ ) e em sua associação com FE ( $p= 0,002$ ) e ácido gálico ( $p= 0,001$ ). A associação de FE e fluconazol também diminuiu a associação de SAP 6 em relação ao grupo fluconazol ( $p= 0,005$ ).

Em relação ao controle não tratado, houve aumento na expressão de ALS3 para FE ( $p= 0,01$ ), e diminuição com fluconazol associado a FE ( $p= 0,03$ ) e ácido gálico ( $p= 0,01$ ). Já em comparação ao fluconazol, apenas sua associação com FE diminuiu a expressão de ALS3. Apenas o fluconazol com FE ( $p= 0,01$ ) e ácido gálico ( $p= 0,03$ ) foi capaz de diminuir a expressão de HWP1 em relação ao controle não tratado. Já em relação ao fluconazol, apenas fluconazol associado a FE demonstrou esta supressão na expressão de HWP1 ( $p= 0,001$ ). Os resultados estão ilustrados na figura 8.

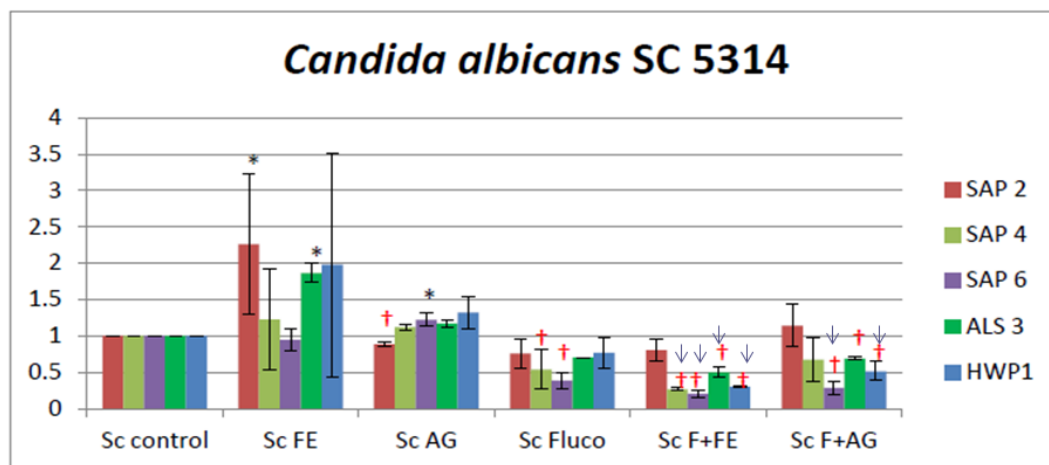


Figura 8 - Resultado da expressão dos genes de virulência em biofilmes de 24 horas: \*Aumento da expressão em relação ao controle; † Diminuição da expressão em relação ao controle; SC: *Candida albicans* SC 5314; Control: não tratado; AG: ácido gálico; FE: Fração enriquecida em fenólicos; Fluco: Fluconazol; F+AE: Fluconazol com a fração enriquecida em fenólicos; F+AG: Fluconazol com ácido gálico; ↓ Diminuição da expressão em relação ao fluconazol.

## 5.5 Obtenção e caracterização química do encapsulado

O perfil do diagrama de fase do complexo ácido gálico/ $\beta$ -CD indicou que a complexação reduziu a solubilidade do ácido gálico (Figura 9). Ao contrário, na formação do complexo ácido gálico/HP- $\beta$ -CD, o aumento concentração de HP- $\beta$ -CD propiciou uma maior solubilidade do ácido gálico. Baseado nesses resultados, as avaliações subsequentes foram realizadas apenas com formulações de ácido gálico/HP- $\beta$ -CD.



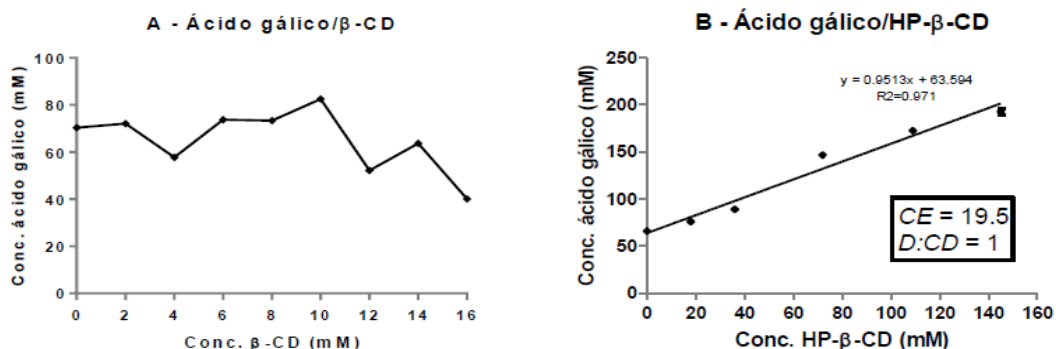


Figura 9- Diagrama de fase do perfil de solubilidade do ácido gálico em ciclodextrinas; A:  $\beta$ -ciclodextrina; B: 2-Hidroxiopropil-  $\beta$ -ciclodextrina; Conc.: Concentração.

Após a secagem, o rendimento final foi de 87 % para a formulação de ácido gálico/ HP- $\beta$ -CD e de 75 % para a fração enriquecida/ HP- $\beta$ -CD. A análise por CLAE demonstrou que o percentual de ácido gálico presente nas formulações ácido gálico/ HP- $\beta$ -CD e de FE/ HP- $\beta$ -CD foi de  $10,05 \pm 2$  % e de  $0,034 \pm 0,0025$  % respectivamente.

Os perfis calorimétricos das substâncias isoladas apresentadas no DSC, bem como as alterações morfológicas apresentadas no MEV, das misturas físicas e dos encapsulados indicam que houve o encapsulamento das substâncias (Figuras 10 e 11).

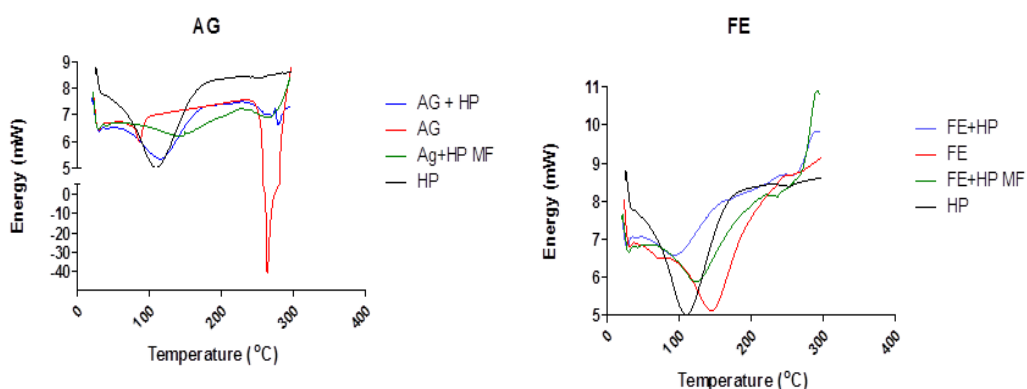


Figura 10- Calorimetria diferencial de varredura da fração enriquecida em fenólicos (FE) e ácido gálico e 2-Hidroxiopropil-  $\beta$ -ciclodextrina (HP) isolados, em mistura física (MF) com FE e ácido gálico (FE+HP MF e HP+AG MF respectivamente) e FE e AG encapsulados em HP (FE+HP e AG+HP respectivamente)

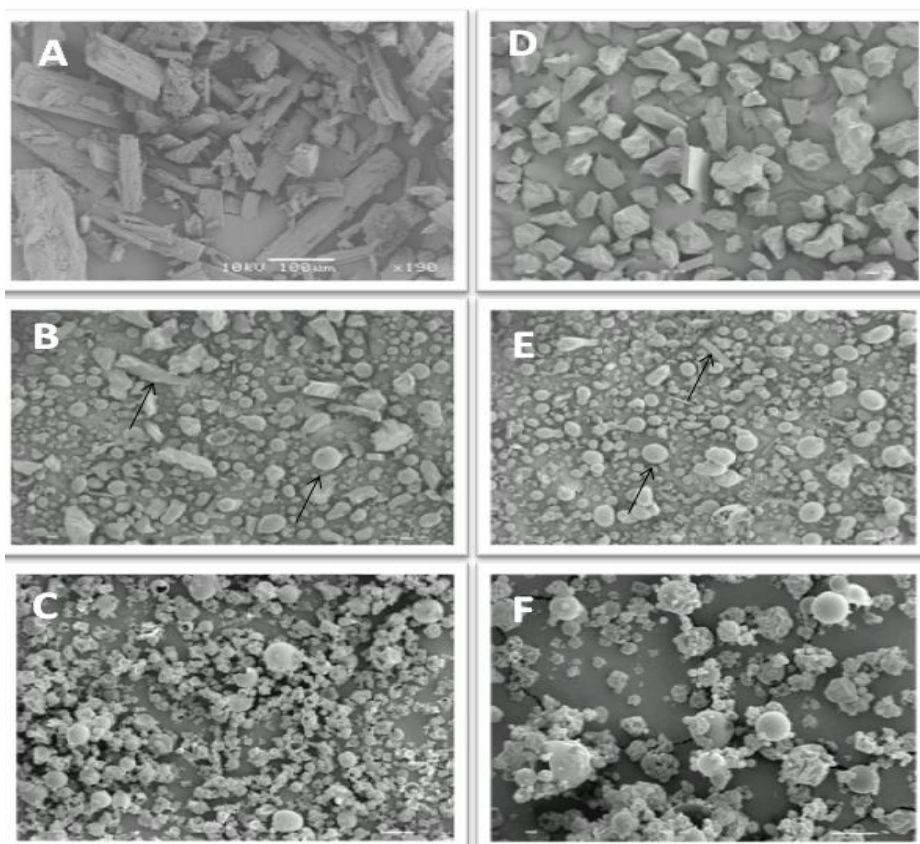


Figura 11 - Microscopia eletrônica de varredura de 2-Hidroxipropil-Beta-Cliclodextrina (HP-β-CD) e fração enriquecida em fenólicos (FE) e ácido gálico; A: FE; B: Mistura física; setas: partícula de HP-β-CD (circular) e FE (cristal); C: Encapsulado: predomínio de alteração morfológica das partículas de HP-β-CD e ausência de cristais de FE; D: ácido gálico; E: Mistura física; setas: partícula de HP-β-CD (circular) e ácido gálico (cristal); F: Encapsulado; predomínio de alteração morfológica das partículas de HP-β-CD.

## 5.6 Avaliação da efetividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* dos encapsulados

Os valores de CIM obtidos para o ácido gálico encapsulado frente às cepas *C. albicans* ATCC 18804 e SC 5314 foram às mesmas obtidas para a molécula não encapsulada (0,625 e 1,25 mg/ml respectivamente). Para a FE, o valor da CIM do encapsulado foi 2,5 mg/ml, sendo o equivalente de ácido gálico foi de 0,0009 mg/ml para ambas cepas de *C. albicans*.

Após os tratamentos com AG encapsulado e a nistatina foi possível perceber uma melhora clínica visual dos palatos que continham lesões eritematosas provavelmente causadas por *C. albicans* (Figura 12). Todavia, nas lâminas coradas com PAS não foram observadas presença significativa de leveduras ou hifas nem mesmo no controle. No grupo controle, a análise histopatológica das mucosas coradas por HE demonstraram áreas de hiperqueratinização e áreas de degeneração hidrópica, com moderado infiltrado inflamatório crônico. No grupo tratado com AG encapsulado, o tecido apresentou leve infiltrado inflamatório crônico com áreas de hiperqueratose e exocitose. Já no grupo nistatina, não foi observado infiltrado inflamatório ou hiperqueratose. A figura 13 ilustra a mucosa do palato dos grupos estudados, corada em HE.

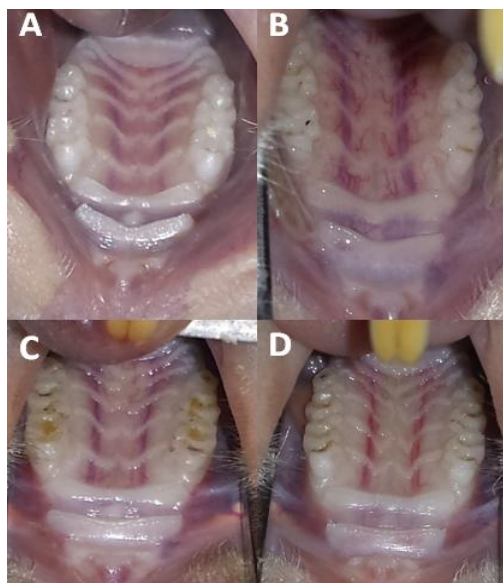


Figura 12- Aspecto clínico do palato de ratos (*Rattus norvegicus*- Wistar). (A) Antes da indução da candidose eritematosa; (B) Após indução de candidose eritematosa; (C) Após 4 dias de tratamento com ácido gálico encapsulado (20 mg/ml); após 4 dias de tratamento com nistatina (100.000 UI).

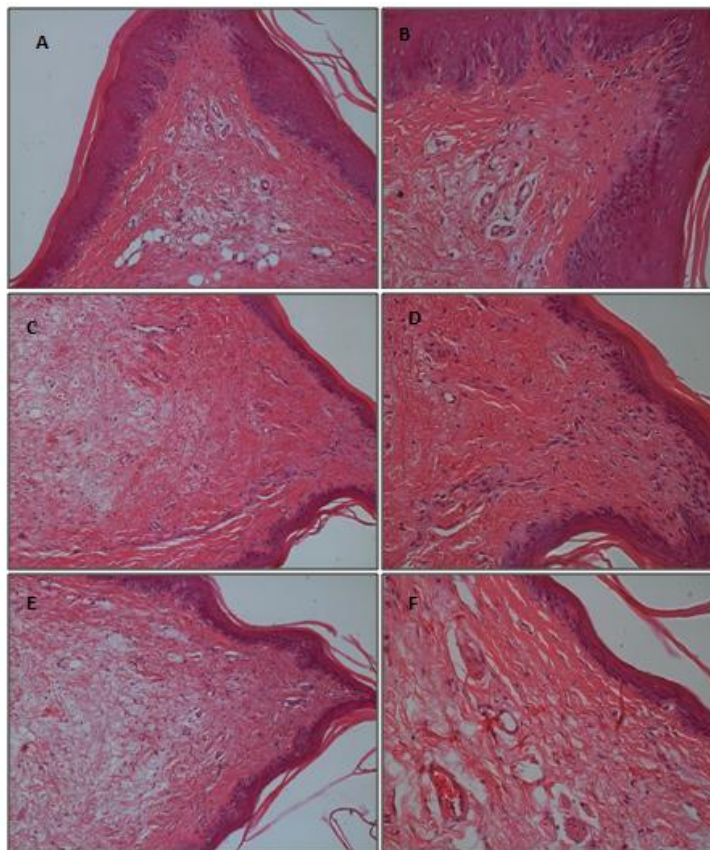


Figura 13 - Fotomicrografia da mucosa palatal (coloração HE) dos animais do grupo Controle: Aumento de 200x (A) e 400x (B); Grupo Ácido gálico: Aumento de 200x (C) e 400x (D); Grupo Nistatina: Aumento de 200x (E) e 400x (F).

### 5.7 Teste de citotoxicidade

A citotoxicidade para AG e FE, nas formas livres ou encapsuladas foi moderada. Observou-se viabilidade celular da linhagem celular Vero de aproximadamente 30 % após tratamento com ácido gálico na Concentração Inibitória Mínima de 5 mg/ml. Não houve diferença significativa da viabilidade celular após tratamento com o ácido gálico em sua forma livre ou complexada ( $p= 0,70$ ). Para a fração enriquecida, a viabilidade foi em torno de 40 % na CIM de 2,5 mg/ml. Também não houve diferença estatisticamente significante da FE na sua forma livre ou

complexada ( $p= 0,85$ ). A viabilidade celular para o gluconato de clorexidina a 1,2 mg/ml (Periogard<sup>®</sup>) foi de 0 %. A figura 14 ilustra os resultados.

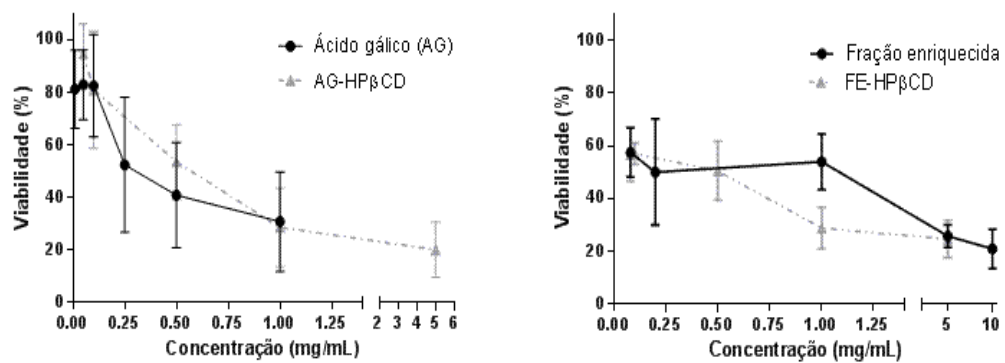


Figura 14 – Citotoxicidade do ácido gálico (AG) e da fração enriquecida (FE) em suas formas livres e complexadas com HPβCD.

## 6 DISCUSSÃO

A análise por ESI-MS demonstrou perfil bastante semelhante ao relatado anteriormente por Teodoro et al. (2015) que também encontraram as moléculas ácido gálico, vetixina, corilagina, kaempferol, (-) epicatequina e ácido elágico em extrato aquoso das folhas de *B. tomentosa*.

Os bons rendimentos na extração bem como boa atividade anti-*Candida albicans* do extrato acetônico de *B. tomentosa* estão de acordo com dados anteriores de observados em extratos acetônicos de outras plantas da família Combretaceae (Masoko et al., 2005, 2007). A extração acetônica obtida neste estudo provavelmente concentrou os componentes fenólicos anteriormente descritos e que novamente foram encontrados pela análise de ESI-MS, o que possivelmente melhorou os valores de CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> frente às cepas de *C. albicans* (Teodoro et al., 2015).

A promissora atividade anti-biofilme de *C. albicans* do ácido gálico encapsulado demonstrada no presente estudo ainda não teve sua atividade encontrada na literatura científica. Entretanto, outros trabalhos já comprovaram anteriormente a atividade do ácido gálico livre (Wang et al., 2009; Alves et al., 2014). No entanto, estudos anteriores utilizaram apenas cepas de referência. O presente estudo objetivou incluir cepas clínicas para avaliar a variação intra-espécie de resposta.

Relatos anteriores da influência do ácido gálico na morfogênese de *C. albicans* também não foram detectados na literatura. Todavia, muitos trabalhos relataram esta influência a partir de outras moléculas fenólicas (He et al., 2007; Pinto et al., 2009; Messie, Grenier, 2011; Zhang et al., 2011) inclusive de derivados de outros ácidos

fenólicos (Sung, Lee, 2010). De forma similar, a influência do ácido gálico na aderência de *C. albicans* ainda não foi relatada, apesar de outros fenólicos já terem apresentado interferência neste importante fator de virulência (Feldman et al., 2012; Rane et al., 2014; Shahzad et al., 2014). A não influência do ácido gálico na produção de exoenzimas por *C. albicans* discorda de Gabriela et al. (2014) que verificou tal influência no tratamento com outros compostos fenólicos. Entretanto, corrobora com o estudo de Li et al. (2001) que também não encontrou influência de ácido gálico na diminuição da produção de proteinases por *C. albicans*.

O extrato de *B. tomentosa* foi capaz de inibir a formação de biofilme de *C. albicans* em concentração de 1/2 CIM. Resultado similar foi observado por Capoci et al. (2015) que observou efeito semelhante em 1/2 CIM de extrato de própolis que também continha ácido gálico. A influência na morfogênese e não influência na produção de exoenzimas por *C. albicans* de extratos naturais (Gabriela et al., 2014) estão de acordo com os resultados deste estudo. Porém, não foi detectado na literatura nenhum estudo realizado sobre a atividade anti-biofilme ou outro fator de virulência de *Candida* spp. com extratos de espécies de *Buchenavia* ou outra planta da família Combretaceae.

Os resultados demonstraram que a diminuição da expressão dos genes estudados foi melhor efetiva quando houve associação do ácido gálico ou FE com o fluconazol. Tais resultados discordam de Cheng et al. (2009) e Li et al. (2012) que encontram diminuição da expressão de ALS3 e HWP1 no tratamento de biofilmes de *C. albicans* com o fenólico ricardina D não combinado com outro antifúngico. Entretanto, concordam com os outros estudos que observaram diminuição na expressão de genes referentes à resistência ao fluconazol quando moléculas fenólicas estão em sinergismo com este antifúngico (Guo et al., 2009; Ahmad et al., 2013; Zhu et al., 2014). O estímulo da produção de farnesol via estímulo do gene *Dpp3* foi verificado após tratamento com o fenólico bisbibenzil (Zhang et al., 2011). Sendo o

farnesol um inibidor de formação de hifas, futuramente tal influência de FE e do ácido gálico poderiam ser verificadas, já que ambos tiveram ação na diminuição da formação de hifas por *C. albicans*.

A HP- $\beta$ -CD foi capaz de aumentar a solubilidade do ácido gálico em água, o que não foi observado para  $\beta$ -CD. No presente estudo, a melhor atividade do ácido gálico encapsulado com HP- $\beta$ -CD está de acordo (Loftsson et al., 2005), que descreve que esta ciclodextrina tem sido eficiente para o encapsulamento e conseqüentemente melhora da solubilidade de diversas substâncias. Entretanto, existem outras moléculas que foram bem encapsuladas em  $\beta$ -CD (Loftsson, Brewster, 2010). Além disso, por uma técnica de microencapsulamento diferente da usada neste estudo, da Rosa et al. (2013) obteve bom encapsulamento do ácido gálico em  $\beta$ -CD. As mudanças morfológicas observadas nas análises de MEV bem como os diferentes perfis calorimétricos observados na calorimetria diferencial de varredura são aceitas como indício de encapsulamento. Tais mudanças observadas nestes dois parâmetros no presente estudo foram também observadas Olga et al. (2015) também no encapsulamento de ácido gálico com HP- $\beta$ -CD. Entretanto apesar da literatura relatar o encapsulamento do ácido gálico com ciclodextrinas e atividade anti-biofilme por *Candida* spp. para ácido gálico e compostos que os contenha (Alves et al., 2014; Capoci et al., 2015), não foi detectado estudo anterior que tenha avaliado o efeito do ácido gálico encapsulado com ciclodextrinas sobre biofilmes de *Candida*.

Considerando as CIMs pré-determinadas de AG (5 mg/ml) e de FE (2,5 mg/ml), O ácido gálico, mostrou-se no limite entre a toxicidade moderada e severa de acordo com Sletten e Dahl (1999). O presente resultado está de acordo trabalhos anteriores que demonstraram viabilidades celulares semelhantes em concentrações de ácido gálico entre 1 e 5 mg/ml (de Paula et al., 2014; Pinho et al., 2014). A fração enriquecida (FE) apresentou uma citotoxicidade moderada, resultado que discorda com Teodoro et al. (2015) que observaram leve citotoxicidade



(cerca de 60% de viabilidade celular) na presença de um extrato aquoso das folhas de *B.tomentosa*. No tratamento das células com o gluconato de clorexidina a 1,2 mg/ml (controle positivo), a viabilidade celular foi de 0%. Mesmo assim, esta substância é amplamente utilizada, de forma tópica, para controle de infecções bucais (Mhaske et al., 2012), inclusive na candidose eritematosa associada a estomatite protética (Salim et al., 2012). Da mesma maneira, AG e FE podem ser sugeridos como possíveis alternativas para o controle da candidose eritematosa associada ao uso de prótese, pois foram menos citotóxicas que a clorexidina.

Apesar de possibilidade de produtos encapsulados apresentarem menor citotoxicidade (Tiwari et al., 2010), o presente estudo não observou tal efeito nem para o AG nem para a FE.

A adaptação da metodologia da indução da candidose no palato dos animais demonstrou-se a princípio suficiente para estabelecimento da lesão, entretanto a não observação da presença de leveduras ou hifas no palato dos animais, apesar das aparentes lesões eritematosas, inspiram novos estudos para adequação metodológica.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram que dentre as diversas frações obtidas a partir de um extrato aquoso das folhas de *B. tomentosa*, a fração acetônica foi a mais efetiva contra cepas padrão e isolados de candidose eritematosa de *C. albicans*. Além disso, foi possível observar a presença das moléculas fenólicas com potencial antifúngico previamente descrito na análise da FE por ESI-MS. Destas moléculas estudadas, o ácido gálico demonstrou ser a mais promissora contra *C. albicans*. Tanto FE quanto o ácido gálico foram eficazes no controle dos fatores de virulência de *C. albicans*, com exceção da expressão de exoenzimas. Foi possível encapsulamento em HP- $\beta$ -CD tanto da FE quanto o ácido gálico. Todavia, como o efeito da FE não encapsulada foi suficiente para controlar o biofilme e as concentrações 2 e 4 vezes a CIM para esta substância eram solúveis em água, a ação anti-biofilme foram testadas para o ácido gálico 4 vezes CIM, concentração já insolúvel em água (20 mg/ml). A citotoxicidade para o AG e FE, encapsulado ou não, foi moderada. Com o tratamento dos animais com AG encapsulado e nistatina, observou-se melhora clínica da candidose eritematosa induzida nos ratos.

## 8 REFERÊNCIAS \*

Ahmad A, Khan A, Manzoor N. Reversal of efflux mediated antifungal resistance underlies synergistic activity of two monoterpenes with fluconazole. *Eur J Pharm Sci.* 2013;48(1-2):80-6. doi: 10.1016/j.ejps.2012.09.016.

Al-Fattani MA, Douglas LJ. Penetration of *Candida* biofilms by antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(9):3291-7.

Alves CT, Ferreira IC, Barros L, Silva S, Azeredo J, Henriques M. Antifungal activity of phenolic compounds identified in flowers from North Eastern Portugal against *Candida* species. *Future Microbiol.* 2014;9(2):139-46. doi: 10.2217/fmb.13.147.

Aoki S, Ito-Kuwa S, Nakamura Y, Masuhara T. Comparative pathogenicity of a wild-type strain and respiratory mutants of *Candida albicans* in mice. *Zentralbl Bakteriol.* 1990 Aug;273(3):332-43.

Aperis G, Myriounis N, Spanakis EK, Mylonakis E. Developments in the treatment of candidiasis: more choices and new challenges. *Expert Opin Investig Drugs.* 2006 Nov;15(11):1319-36.

Arendrup MC. Epidemiology of invasive candidiasis. *Curr Opin Crit Care.* 2010 Oct;16(5):445-52. doi: 10.1097/MCC.0b013e32833e84d2.

Arita M, Nagayoshi M, Fukuizumi T, Okinaga T, Masumi S, Morikawa M, et al. Microbicidal efficacy of ozonated water against *Candida albicans* adhering to acrylic denture plates. *Oral Microbiol Immunol.* 2005 Aug;20(4):206-10.

Ayala-Zavala JF, González-Aguilar GA. Optimizing the use of garlic oil as antimicrobial agent on fresh-cut tomato through a controlled release system. *J Food Sci.* 2010 Sep;75(7):M398-405. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01723.x.

Baba-Moussa F, Akpagana K, Bouchet P. Antifungal activities of seven West African Combretaceae used in traditional medicine. *J Ethnopharmacol.* 1999 Sep;66(3):335-8.

---

\* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 20 ago 2013; acesso em 25 out 2015]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Balducci A, Magosso E, Colombo G, Sonvico F, Khan N, Yuen K, et al. Agglomerated oral dosage forms of artemisinin/cyclodextrin spray-dried primary microparticles showing increased dissolution rate and bioavailability. *AAPS PharmSciTech*. 2013 Sep;14(3):911-8. doi: 10.1208/s12249-013-9982-9.

Bates DW, Su L, Yu DT, Chertow GM, Seger DL, Gomes DR, et al. Correlates of acute renal failure in patients receiving parenteral amphotericin B. *Kidney Int*. 2001 Oct;60(4):1452-9.

Bieski IG, Rios Santos F, de Oliveira RM, Espinosa MM, Macedo M, Albuquerque UP, et al. Ethnopharmacology of medicinal plants of the pantanal region (mato grosso, Brazil). *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012;2012:272749. doi: 10.1155/2012/272749.

Borg-von Zepelin M, Kunz L, Ruchel R, Reichard U, Weig M, Gross U. Epidemiology and antifungal susceptibilities of *Candida* spp. to six antifungal agents: results from a surveillance study on fungaemia in Germany from July 2004 to August 2005. *J Antimicrob Chemother*. 2007 Aug;60(2):424-8.

Brandao MG, Cosenza GP, Pereira FL, Vasconcelos AS, Fagg CW. Changes in the trade in native medicinal plants in Brazilian public markets. *Environ Monit Assess*. 2013 Aug;185(8):7013-23. doi: 10.1007/s10661-013-3081-y.

Brandao MG, Cosenza GP, Stanislau AM, Fernandes GW. Influence of Brazilian herbal regulations on the use and conservation of native medicinal plants. *Environ Monit Assess*. 2010 May;164(1-4):369-77. doi: 10.1007/s10661-009-0899-4.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada nº 14, de 31 de Março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. *Diário Oficial da União* 05 Abr 2010.

Brasil. Decreto nº 5.813, de 22 de Junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. *Diário Oficial da União* 23 jun 2006 [acesso em 07 Mar 2016]. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2004-2006/2006/Decreto/D5813.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2006/Decreto/D5813.htm).

Brighenti FL, Salvador MJ, Delbem AC, Delbem AC, Oliveira MA, Soares CP, et al. Systematic screening of plant extracts from the Brazilian Pantanal with antimicrobial activity against bacteria with cariogenic relevance. *Caries Res*. 2014;48(5):353-60. doi: 10.1159/000357225.

Brito AR, Brito AA. Forty years of Brazilian medicinal plant research. *J Ethnopharmacol.* 1993;39(1):53-67.

Bruneton J. *Pharmacognosie: phytochimie, plantes médicinales.* Éditions Tec & Doc: Paris, France; 1999.

Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 2001;9(7):327-35.

Capoci IR, Bonfim-Mendonca Pde S, Arita GS, Pereira RR, Consolaro ME, Bruschi ML, et al. Propolis is an efficient fungicide and inhibitor of biofilm production by vaginal *Candida albicans*. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015;2015:287693. doi: 10.1155/2015/287693.

Cheng A, Sun L, Wu X, Lou H. The inhibitory effect of a macrocyclic bisbibenzyl riccardin D on the biofilms of *Candida albicans*. *Biol Pharm Bull.* 2009 Aug;32(8):1417-21.

Cheng L, Exterkate RA, Zhou X, Li J, ten Cate JM. Effect of *Galla chinensis* on growth and metabolism of microcosm biofilms. *Caries Res.* 2011;45(2):87-92. doi: 10.1159/000324084.

Chevalier M, Medioni E, Precheur I. Inhibition of *Candida albicans* yeast-hyphal transition and biofilm formation by *Solidago virgaurea* water extracts. *J Med Microbiol.* 2012 Jul;61(Pt 7):1016-22. doi: 10.1099/jmm.0.041699-0.

Chirinos R, Betalleluz-Pallardel I, Huamán A, Arbizu C, Pedreschi R, Campos D. HPLC-DAD characterisation of phenolic compounds from Andean oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) tubers and their contribution to the antioxidant capacity. *Food Chem.* 2009 Apr 15;113(4):1243-51. doi:10.1016/j.foodchem.2008.08.015.

CLSI. Document M27-A3: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, approved standard. 3 ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

Crastechini EMS, Teodoro GR, Koga-Ito CY, Almeida JD. Efeitos do óleo ozonizado na presença do gênero *Candida* em pacientes com estomatite protética. In: 26ª Reunião Anual da SBPqO, 09-13 set 2009. Águas de Lindóia. *Brazilian Oral Research.* 2009;23(1):96.

da Rosa CG, Borges CD, Zambiasi RC, Nunes MR, Benvenuti EV, Luz SRd, et al. Microencapsulation of gallic acid in chitosan,  $\beta$ -cyclodextrin and xanthan. *Ind Crops Prod.* 2013 Apr;46:138-46. doi:10.1016/j.indcrop.2012.12.053

da Silva NMF, Valente MC. Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Combretaceae. *Rodriguésia*. 2005;56(86):131-40.

de Paula E Silva AC, Costa-Orlandi CB, Gullo FP, Sangalli-Leite F, de Oliveira HC, da Silva Jde F, et al. Antifungal activity of decyl gallate against several species of pathogenic fungi. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014;2014:506273. doi: 10.1155/2014/506273.

Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci*. 1999;65(4):337-53.

Embrapa [internet]. Pantanal [acesso em 07 Mar 2015]. Disponível em: <http://www.cpap.embrapa.br>

Fanning S, Mitchell AP. Fungal biofilms. *PLoS Pathog*. 2012;8(4):e1002585. doi: 10.1371/journal.ppat.1002585.

Farnsworth NR. Testando plantas para novos remédios. In: EO Wilson. *Biodiversidade*. Rio de Janeiro: Nova Fronteira; 1997. p. 107-125.

Feldman M, Tanabe S, Howell A, Grenier D. Cranberry proanthocyanidins inhibit the adherence properties of *Candida albicans* and cytokine secretion by oral epithelial cells. *BMC Complement Altern Med*. 2012 Jan 16;12:6.

Figueiral MH, Azul A, Pinto E, Fonseca PA, Branco FM, Scully C. Denture-related stomatitis: identification of aetiological and predisposing factors - a large cohort. *J Oral Rehabil*. 2007;34(6):448-55.

Gabriela N, Rosa AM, Catiana ZI, Soledad C, Mabel OR, Esteban SJ, et al. The effect of *Zuccagnia punctata*, an Argentine medicinal plant, on virulence factors from candida species. *Nat Prod Commun*. 2014 Jul;9(7):933-6.

Gawande PV, LoVetri K, Yakandawala N, Romeo T, Zhanel GG, Cvitkovitch DG, et al. Antibiofilm activity of sodium bicarbonate, sodium metaperiodate and SDS combination against dental unit waterline-associated bacteria and yeast. *J Appl Microbiol*. 2008 Oct;105(4):986-92. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03823.x.

Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J Prosthodont*. 2011 Jun;20(4):251-60. doi: 10.1111/j.1532-849X.2011.00698.x.

Ghisalberti EL. Detection and Isolation of Bioactive Natural Products In: Colegate SM, Molyneux RJ. Bioactive Natural Products: detection, isolation and structural determination. 2° ed. London, New York: CRC Press; 2007. p. 11-76.

Govindarajan R, Vijayakumar M, Singh M, Rao Ch V, Shirwaikar A, Rawat AK, et al. Antiulcer and antimicrobial activity of *Anogeissus latifolia*. J Ethnopharmacol. 2006 Jun 15;106(1):57-61.

Guo N, Liu J, Wu X, Bi X, Meng R, Wang X, et al. Antifungal activity of thymol against clinical isolates of fluconazole-sensitive and -resistant *Candida albicans*. J Med Microbiol. 2009 Aug;58(Pt 8):1074-9. doi: 10.1099/jmm.0.008052-0.

Hammer KA, Carson CF, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil inhibits germ tube formation by *Candida albicans*. Med Mycol. 2000 Oct;38(5):355-62.

He M, Du M, Fan M, Bian Z. In vitro activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms. Mycopathologia. 2007 Mar;163(3):137-43.

Holder IA, Boyce ST. Agar well diffusion assay testing of bacterial susceptibility to various antimicrobials in concentrations non-toxic for human cells in culture. Burns. 1994 Oct;20(5):426-9.

Hoyer LL. The ALS gene family of *Candida albicans*. Trends Microbiol. 2001 Apr;9(4):176-80.

Hoyer LL, Green CB, Oh SH, Zhao X. Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) gene family--a sticky pursuit. Med Mycol. 2008 Feb;46(1):1-15.

Hube B. From commensal to pathogen: stage- and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*. Curr Opin Microbiol. 2004 Aug;7(4):336-41.

Jayatilake JA, Samaranayake YH, Cheung LK, Samaranayake LP. Quantitative evaluation of tissue invasion by wild type, hyphal and SAP mutants of *Candida albicans*, and non-*albicans* *Candida* species in reconstituted human oral epithelium. J Oral Pathol Med. 2006 Sep;35(8):484-91.

Johnson MD, Perfect JR. Caspofungin: first approved agent in a new class of antifungals. Expert Opin Pharmacother. 2003 May;4(5):807-23.

Junqueira JC, Colombo CE, Martins Jda S, Koga Ito CY, Carvalho YR, Jorge AO. Experimental candidosis and recovery of *Candida albicans* from the oral cavity of ovariectomized rats. *Microbiol Immunol*. 2005;49(3):199-207.

Kalogeropoulos N, Konteles S, Mourtzinou I, Troullidou E, Chiou A, Karathanos VT. Encapsulation of complex extracts in beta-cyclodextrin: an application to propolis ethanolic extract. *J Microencapsul*. 2009 Nov;26(7):603-13. doi: 10.3109/02652040802586373.

Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*. 2013 Feb 19;18(2):2328-75. doi: 10.3390/molecules18022328.

Lee MK, Yong D, Kim M, Kim MN, Lee K. [Species distribution and antifungal susceptibilities of yeast clinical isolates from three hospitals in Korea, 2001 to 2007]. *Korean J Lab Med*. 2010 Aug;30(4):364-72. doi: 10.3343/kjlm.2010.30.4.364.

Leitao DP, Filho AA, Polizello AC, Bastos JK, Spadaro AC. Comparative evaluation of in-vitro effects of Brazilian green propolis and *Baccharis dracunculifolia* extracts on cariogenic factors of *Streptococcus mutans*. *Biol Pharm Bull*. 2004 Nov;27(11):1834-9.

Lewis JS 2nd, Graybill JR. Fungicidal versus Fungistatic: what's in a word? *Expert Opin Pharmacother*. 2008 Apr;9(6):927-35. doi: 10.1517/14656566.9.6.927.

Li XC, Jacob MR, Pasco DS, ElSohly HN, Nimrod AC, Walker LA, et al. Phenolic compounds from *Miconia myriantha* inhibiting *Candida aspartic* proteases. *J Nat Prod*. 2001;64(10):1282-5.

Li Y, Ma Y, Zhang L, Guo F, Ren L, Yang R, et al. In vivo inhibitory effect on the biofilm formation of *Candida albicans* by liverwort derived riccardin D. *PLoS One*. 2012;7(4):e35543. doi: 10.1371/journal.pone.0035543.

Loftsson T, Brewster ME. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development. *J Pharm Pharmacol*. 2010 Nov;62(11):1607-21. doi: 10.1111/j.2042-7158.2010.01030.x.

Loftsson T, Hreinsdóttir D, Masson M. Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. *Int J Pharm*. 2005;302(1-2):18-28.

Loftsson T, Hreinsdóttir D, Másson M. The complexation efficiency. *J Incl Phenom Macrocycl Chem*. 2007;57(1-4):545-52. doi: 10.1007/s10847-006-9247-2.



Maciel MAM, Pinto AC, Veiga Jr. VF, Grynberg NF, Echevarria A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quím Nova*. 2002;25(3):429-38.

Macura AB, Tondyra E. Influence of some carbohydrates and concanavalin A on the adherence of *Candida albicans* in vitro to buccal epithelial cells. *Zentralbl Bakteriol*. 1989 Dec;272(2):196-201.

Marcos-Arias C, Eraso E, Madariaga L, Aguirre JM, Quindos G. Phospholipase and proteinase activities of *Candida* isolates from denture wearers. *Mycoses*. 2011 Jul;54(4):e10-6. doi: 10.1111/j.1439-0507.2009.01812.x.

Masoko P, Picard J, Eloff JN. Antifungal activities of six South African *Terminalia* species (Combretaceae). *J Ethnopharmacol*. 2005;99(2):301-8.

Masoko P, Picard J, Eloff JN. The antifungal activity of twenty-four southern African *Combretum* species (Combretaceae). *S Afr J Bot*. 2007;73(2):173-83.

Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 2013 Feb 15;4(2):119-28. doi: 10.4161/viru.22913.

Messier C, Grenier D. Effect of licorice compounds licochalcone A, glabridin and glycyrrhizic acid on growth and virulence properties of *Candida albicans*. *Mycoses*. 2011 Nov;54(6):e801-6. doi: 10.1111/j.1439-0507.2011.02028.x.

Mhaske M, Samad BN, Jawade R, Bhansali A. Chemical agents in control of dental plaque in dentistry: An overview of current knowledge and future challenges. *Adv Appl Sci Res*. 2012;3(1):268–72.

Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*. 2000 Dec;52(4):673-751.

Miletic T, Kyriakos K, Graovac A, Ibric S. Spray-dried voriconazole-cyclodextrin complexes: Solubility, dissolution rate and chemical stability. *Carbohydrate Polymers*. 2013 Oct;98(1):122-31.

Modrzewska B, Kurnatowski P. Adherence of *Candida* sp. to host tissues and cells as one of its pathogenicity features. *Ann Parasitol*. 2015;61(1):3-9.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.

Mota AC, de Castro RD, de Araujo Oliveira J, de Oliveira Lima E. Antifungal activity of apple cider vinegar on *Candida* species involved in denture stomatitis. *J Prosthodont*. 2015 Jun;24(4):296-302. doi: 10.1111/jopr.12207.

Murciano C, Moyes DL, Runglall M, Tobouti P, Islam A, Hoyer LL, et al. Evaluation of the role of *Candida albicans* agglutinin-like sequence (Als) proteins in human oral epithelial cell interactions. *PLoS One*. 2012;7(3):e33362. doi: 10.1371/journal.pone.0033362.

Naglik JR, Newport G, White TC, Fernandes-Naglik LL, Greenspan JS, Greenspan D, et al. In vivo analysis of secreted aspartyl proteinase expression in human oral candidiasis. *Infect Immun*. 1999 May;67(5):2482-90.

Netea MG, Brown GD, Kullberg BJ, Gow NA. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol*. 2008 Jan;6(1):67-78.

Nett JE, Marchillo K, Spiegel CA, Andes DR. Development and validation of an in vivo *Candida albicans* biofilm denture model. *Infect Immun*. 2010 Sep;78(9):3650-9. doi: 10.1128/IAI.00480-10.

Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod*. 2012 Mar 23;75(3):311-35. doi: 10.1021/np200906s.

Nobile CJ, Schneider HA, Nett JE, Sheppard DC, Filler SG, Andes DR, et al. Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation. *Curr Biol*. 2008 Jul 22;18(14):1017-24. doi: 10.1016/j.cub.2008.06.034.

O'Donnell LE, Millhouse E, Sherry L, Kean R, Malcolm J, Nile CJ, et al. Polymicrobial *Candida* biofilms: friends and foe in the oral cavity. *FEMS Yeast Res*. 2015 Nov;15(7). pii: fov077. doi: 10.1093/femsyr/fov077. Epub 2015 Aug 21.

Ohta H, Tanimoto T, Taniai M, Taniguchi M, Ariyasu T, Arai S, et al. Regulation of *Candida albicans* morphogenesis by tumor necrosis factor- $\alpha$  and potential for treatment of oral candidiasis. *In Vivo*. 2007 Jan-Feb;21(1):25-32.

Okada M, Hisajima T, Ishibashi H, Miyasaka T, Abe S, Satoh T. Pathological analysis of the *Candida albicans*-infected tongue tissues of a murine oral candidiasis model in the early infection stage. *Arch Oral Biol*. 2013 Apr;58(4):444-50. doi: 10.1016/j.archoralbio.2012.09.014.

Olga G, Styliani C, Ioannis RG. Coencapsulation of Ferulic and Gallic acid in hp-b-cyclodextrin. *Food Chem*. 2015 Oct 15;185:33-40. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.03.058.

Panizo MM, Reviakina V, Dolande M, Selgrad S. *Candida* spp. in vitro susceptibility profile to four antifungal agents. Resistance surveillance study in Venezuelan strains. *Med Mycol*. 2009 Mar;47(2):137-43. doi: 10.1080/13693780802144339.

Pascoal AC, Ehrenfried CA, Eberline MN, Stefanello ME, Salvador MJ. Free radical scavenging activity, determination of phenolic compounds and HPLC-DAD/ESI-MS profile of *Campomanesia adamantium* leaves. *Nat Prod Commun*. 2011 Jul;6(7):969-72.

Pereira D, Valentão P, Pereira J, Andrade P. Phenolics: From Chemistry to Biology. *Molecules*. 2009;14(6):2202-11. doi:10.3390/molecules14062202.

Perlroth J, Choi B, Spellberg B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med Mycol*. 2007 Jun;45(4):321-46.

Pfaller MA, Castanheira M, Messer SA, Moet GJ, Jones RN. Variation in *Candida* spp. distribution and antifungal resistance rates among bloodstream infection isolates by patient age: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010;68(3):278-83. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2010.06.015.

Pinho E, Ferreira IC, Barros L, Carvalho AM, Soares G, Henriques M. Antibacterial potential of northeastern Portugal wild plant extracts and respective phenolic compounds. *Biomed Res Int*. 2014;2014:814590. doi: 10.1155/2014/814590.

Pinto E, Vale-Silva L, Cavaleiro C, Salgueiro L. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *J Med Microbiol*. 2009 Nov;58(Pt 11):1454-62. doi: 10.1099/jmm.0.010538-0.

Pitarch A, Nombela C, Gil C. *Candida albicans* biology and pathogenicity: insights from proteomics. *Methods Biochem Anal*. 2006;49:285-330.

Polak A. Virulence of *Candida albicans* mutants. *Mycoses*. 1992 Jan-Feb;35(1-2):9-16.

Pott A, Oliveira AK, Damasceno-Junior GA, Silva JS. Plant diversity of the Pantanal wetland. *Braz J Biol*. 2011 Apr;71(1 Suppl 1):265-73.

Pott A, Pott VJ. *Plantas do Pantanal*. Brasília: Embrapa; 1994.

Raad, II, Hanna HA. Intravascular catheter-related infections: new horizons and recent advances. *Arch Intern Med*. 2002;162(8):871-8.

Rajendran R, Robertson DP, Hodge PJ, Lappin DF, Ramage G. Hydrolytic enzyme production is associated with *Candida albicans* biofilm formation from patients with type 1 diabetes. *Mycopathologia*. 2010 Oct;170(4):229-35. doi: 10.1007/s11046-010-9319-0.

Ramage G, Martinez JP, Lopez-Ribot JL. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res*. 2006 Nov;6(7):979-86.

Ramage G, Saville SP, Thomas DP, Lopez-Ribot JL. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell*. 2005 Apr;4(4):633-8.

Rane HS, Bernardo SM, Howell AB, Lee SA. Cranberry-derived proanthocyanidins prevent formation of *Candida albicans* biofilms in artificial urine through biofilm- and adherence-specific mechanisms. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69(2):428-36. doi: 10.1093/jac/dkt398.

Rangkadilok N, Tongchusak S, Boonhok R, Chaiyaroj SC, Junyaprasert VB, Buajeeb W, et al. In vitro antifungal activities of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed extract. *Fitoterapia*. 2012 Apr;83(3):545-53. doi: 10.1016/j.fitote.2011.12.023.

Regezi JA, Sciubba JJ, Jordan RC. *Patologia oral: correlações clinicopatológicas*. 6. ed. São Paulo, Rio de Janeiro: Elsevier; 2013.

Richardson MD. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. *J Antimicrob Chemother*. 2005 Sep;56 Suppl 1:i5-i11.

Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Benink HA, Worzella TJ, Minor L. *Cell Viability Assays. Assay Guidance Manual* [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004 [acesso em 15 Out 2015]. Disponível em: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/pdf/Bookshelf\\_NBK144065.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/pdf/Bookshelf_NBK144065.pdf)

Rudrangi SRS, Bhomia R, Trivedi V, Vine GJ, Mitchell JC, Alexander BD, et al. Influence of the preparation method on the physicochemical properties of indomethacin and methyl-beta-cyclodextrin complexes. *Int J Pharm.* 2015 Feb 20;479(2):381-90. doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.01.010.

Salim N, Moore C, Silikas N, Satterthwaite JD, Rautemaa R. Fungicidal amounts of antifungals are released from impregnated denture lining material for up to 28 days. *J Dent.* 2012 Jun;40(6):506-12. doi: 10.1016/j.jdent.2012.02.016.

Salvador MJ, Dias DA. Flavone C-glycosides from *Alternanthera maritima* (Mart.) St. Hil. (Amaranthaceae). *Biochem System Ecol.* 2004a;32(1):107-10. doi: 10.1016/S0305-1978(03)00180-7.

Salvador MJ, Ferreira EO, Mertens-Talcott SU, De Castro WV, Butterweck V, Derendorf H, et al. Isolation and HPLC quantitative analysis of antioxidant flavonoids from *Alternanthera tenella* Colla. *Z Naturforsch C.* 2006;61(1-2):19-25.

Salvador MJ, Zucchi OLAD, Candido RC, Ito IY, Dias DA. In vitro Antimicrobial Activity of Crude Extracts and Isolated Constituents of *Alternanthera maritima*. *Pharm Biol.* 2004b;42(2):138-48. doi: 10.1080/13880200490511954.

Sanita PV, Machado AL, Pavarina AC, Massucato EM, Colombo AL, Vergani CE. Microwave denture disinfection versus nystatin in treating patients with well-controlled type 2 diabetes and denture stomatitis: a randomized clinical trial. *Int J Prosthodont.* 2012 May-Jun;25(3):232-44.

Santos VR, Gomes RT, de Mesquita RA, de Moura MD, Franca EC, de Aguiar EG, et al. Efficacy of Brazilian propolis gel for the management of denture stomatitis: a pilot study. *Phytother Res.* 2008 Nov;22(11):1544-7. doi: 10.1002/ptr.2541.

Scartezzini P, Speroni E. Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity. *J Ethnopharmacol.* 2000 Jul;71(1-2):23-43.

Schinor EC, Salvador MJ, Tomaz JC, Pral EMF, Alfieri SC, Albuquerque Sd, et al. Biological activities and chemical composition of crude extracts from *Chresta exsucca*. *Rev Bras Cienc Farm.* 2006 Jan-Mar;42:83-90. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-93322006000100009>.

Schinor EC, Salvador MJ, Turatti IC, Zucchi OL, Dias DA. Comparison of classical and ultrasound-assisted extractions of steroids and triterpenoids from three *Chresta* spp. *Ultrason Sonochem*. 2004 Sep;11(6):415-21.

Schmourlo G, Mendonca-Filho RR, Alviano CS, Costa SS. Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. *J Ethnopharmacol*. 2005 Jan;96(3):563-8.

Shahzad M, Sherry L, Rajendran R, Edwards CA, Combet E, Ramage G. Utilising polyphenols for the clinical management of *Candida albicans* biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2014;44(3):269-73. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2014.05.017.

Silver LL, Bostian KA. Discovery and development of new antibiotics: the problem of antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993 Mar;37(3):377-83.

Sletten GBG, Dahl JE. Cytotoxic effects of extracts of compomers. *Acta Odontol Scand*. 1999;57(6):316-22.

Souza JG, Tomei RR, Kanashiro A, Kabeya LM, Azzolini AE, Dias DA, et al. Ethanolic crude extract and flavonoids isolated from *Alternanthera maritima*: neutrophil chemiluminescence inhibition and free radical scavenging activity. *Z Naturforsch C*. 2007 May-Jun;62(5-6):339-47.

Spellberg B, Marr K, Filler S. *Candida*: what should clinicians and scientists be talking about? In: Calderone R, Clancy C (eds). *Candida and Candidiasis*. 2. ed. Washington DC: ASM Press; 2012. p. 1-8. doi: 10.1128/9781555817176.ch1.

Staab JF, Bahn YS, Tai CH, Cook PF, Sundstrom P. Expression of transglutaminase substrate activity on *Candida albicans* germ tubes through a coiled, disulfide-bonded N-terminal domain of Hwp1 requires C-terminal glycosylphosphatidylinositol modification. *J Biol Chem*. 2004 Sep 24;279(39):40737-47.

Staab JF, Bradway SD, Fidel PL, Sundstrom P. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science*. 1999 Mar 5;283(5407):1535-8.

Sletten GB, Dahl JE. Cytotoxic effects of extracts of compomers. *Acta Odontol Scand*. 1999 Dec;57(6):316-22.

Stoldt VR, Sonneborn A, Leuker CE, Ernst JF. Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *Embo J*. 1997 Apr 15;16(8):1982-91.

Sung WS, Lee DG. Antifungal action of chlorogenic acid against pathogenic fungi, mediated by membrane disruption. *Pure Appl. Chem*. 2010;82(1):219-26. doi: 10.1351/PAC-CON-09-01-08.

Takarada K, Kimizuka R, Takahashi N, Honma K, Okuda K, Kato T. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. *Oral Microbiol Immunol*. 2004;19(1):61-4.

Teodoro GR, Brighenti FL, Delbem AC, Delbem AC, Khouri S, Gontijo AV, et al. Antifungal activity of extracts and isolated compounds from *Buchenavia tomentosa* on *Candida albicans* and non-*albicans*. *Future Microbiol*. 2015;10:917-27. doi: 10.2217/fmb.15.20.

Teixeira KI, Araújo PV, Neves BR, Mahecha GA, Sinisterra RD, Cortés ME. Ultrastructural changes in bacterial membranes induced by nano-assemblies  $\beta$ -cyclodextrin chlorhexidine: SEM, AFM, and TEM evaluation. *Pharm Dev Technol*. 2013 May-Jun ;18(3):600-8. doi: 10.3109/10837450.2011.649853.

Tewes F, Brillault J, Couet W, Olivier J-C. Formulation of rifampicin-cyclodextrin complexes for lung nebulization. *J Control Release*. 2008 Jul 14;129(2):93-9. doi: 10.1016/j.jconrel.2008.04.007.

Tiwari G, Tiwari R, Rai AK. Cyclodextrins in delivery systems: Applications. *J Pharm Bioallied Sci*. 2010 Apr;2(2):72-9. doi: 10.4103/0975-7406.67003.

Tsang CS, Chu FC, Leung WK, Jin LJ, Samaranayake LP, Siu SC. Phospholipase, proteinase and haemolytic activities of *Candida albicans* isolated from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus. *J Med Microbiol*. 2007 Oct;56(Pt 10):1393-8.

Vuong C, Kocianova S, Voyich JM, Yao Y, Fischer ER, DeLeo FR, et al. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J Biol Chem*. 2004;279(52):54881-6.

Wang C, Cheng H, Guan Y, Wang Y, Yun Y. [In vitro activity of gallic acid against *Candida albicans* biofilms]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2009;34(9):1137-40.

Wangchuk P, Keller PA, Pyne SG, Taweechotipatr M, Tonsomboon A, Rattanajak R, et al. Evaluation of an ethnopharmacologically selected Bhutanese medicinal plants for their major classes of phytochemicals and biological activities. *J Ethnopharmacol.* 2011 Sep 1;137(1):730-42. doi: 10.1016/j.jep.2011.06.032.

Watanabe T, Samaranayake LP, Egusa H, Yatani H, Seneviratne CJ. Transcriptional regulation of drug-resistance genes in *Candida albicans* biofilms in response to antifungals. *J Med Microbiol.* 2011 Sep;60(Pt 9):1241-7. doi: 10.1099/jmm.0.030692-0.

Waterhouse AL. Wine phenolics. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;957:21-36.

Weisheimer V, Miron D, Silva CB, Guterres SS, Schapoval EE. Microparticles containing lemongrass volatile oil: preparation, characterization and thermal stability. *Pharmazie.* 2010 Dec;65(12):885-90.

Wellmer A, Bernhardt H. Adherence on buccal epithelial cells and germ tube formation in the continuous flow culture of clinical *Candida albicans* isolates. *Mycoses.* 1997 Dec;40(9-10):363-8.

World Health Organization. *Traditional Medicine Strategy 2002–2005.* Geneva: WHO; 2002.

World Health Organization. *The world medicines situation 2011. Traditional medicine: global situation, issues and challenges.* Geneva: WHO; 2011:12.

Williams DW, Kuriyama T, Silva S, Malic S, Lewis MA. *Candida* biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. *Periodontol 2000.* 2011 Feb;55(1):250-65. doi: 10.1111/j.1600-0757.2009.00338.x.

Yang B, Lin J, Chen Y, Liu Y. Artemether/hydroxypropyl-beta-cyclodextrin host-guest system: Characterization, phase-solubility and inclusion mode. *Bioorg Med Chem.* 2009;17(17):6311-7. doi: 10.1016/j.bmc.2009.07.060.

Yordanov M, Dimitrova P, Patkar S, Saso L, Ivanovska N. Inhibition of *Candida albicans* extracellular enzyme activity by selected natural substances and their application in *Candida* infection. *Can J Microbiol.* 2008 Jun;54(6):435-40. doi: 10.1139/w08-029.

Yu DT, Peterson JF, Seger DL, Gerth WC, Bates DW. Frequency of potential azole drug-drug interactions and consequences of potential fluconazole drug interactions. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 2005 Nov;14(11):755-67.



Zhang L, Chang W, Sun B, Groh M, Speicher A, Lou H. Bisbibenzyls, a new type of antifungal agent, inhibit morphogenesis switch and biofilm formation through upregulation of DPP3 in *Candida albicans*. PLoS One. 2011;6(12):e28953. doi: 10.1371/journal.pone.0028953.

Zhu SL, Yan L, Zhang YX, Jiang ZH, Gao PH, Qiu Y, et al. Berberine inhibits fluphenazine-induced up-regulation of CDR1 in *Candida albicans*. Biol Pharm Bull. 2014;37(2):268-73.

## ANEXO A - Comitê de Ética Local (CEPa) em pesquisa envolvendo animais

---

  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Dimas  
CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9028  
Fax (12) 3947-9010 / yasmin@fosjc.unesp.br

---



**CERTIFICAMOS**, que o protocolo nº **09/2012-PA/CEP**, sobre “**Atividade antifúngica da fração enriquecida em fenólicos de Buchenavia tomentosa e de algumas substâncias isoladas antes e após encapsulação com beta-ciclodextrina**”, sob a responsabilidade de **CRISTIANE YUMI KOGA ITO**, tendo como orientado **GUILHERME RODRIGUES TEODORO**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal – **CONCEA** e Lei Arouca nº 11.794 de 08/10/2008 e foi aprovado por este Comitê de Ética.

São José dos Campos, 14 de novembro de 2012.



Prof.Assist.Dr. **RUBENS NISIE TANGO**  
Coordenador

**Ps:- serão utilizados 32 ratos(macho)**

## ANEXO B - Comitê de Ética (CEP) em pesquisa com seres humanos (Plataforma Brasil, CONEP)

INSTITUTO DE CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA CAMPUS SÃO  
JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA FRAÇÃO ENRIQUECIDA EM FENÓLICOS DE *Buchenavia tomentosa* E DE ALGUMAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS ANTES E APÓS ENCAPSULAÇÃO COM BETA-CICLODEXTRINA

**Pesquisador:** CRISTIANE YUMI KOGA ITO

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 08572912.7.0000.0077

**Instituição Proponente:** Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 367.923

**Data da Relatoria:** 13/08/2013

#### Apresentação do Projeto:

Projeto anteriormente aprovado em 20 de novembro.

#### Objetivo da Pesquisa:

O projeto tem como objetivo geral: Avaliar a efetividade antifúngica *in vitro* da fração enriquecida em fenólicos (FE) das folhas de *B. tomentosa* e das substâncias isoladas ácido gálico, corilagina, kaempferol e vitexina detectadas no extrato aquoso bruto bioativo de *B. tomentosa* e que buscar-se-á estarem presentes na FE. Para FE e para a substância isolada mais bioativa obter-se-á um encapsulado em beta-ciclodextrina e avaliar sua bioatividade antifúngica *in vitro* e *in vivo*; e, como: objetivos específicos: a) Obter a fração enriquecida em fenólicos (FE) a partir do extrato aquoso bioativo das folhas de *B. tomentosa*; b) Avaliar a atividade antifúngica das substâncias isoladas ácido gálico, corilagina, kaempferol e vitexina; c) Avaliar a efetividade *in vitro* das substâncias isoladas e FE por meio de valores de concentração inibitória de formação, erradicação de biofilme de *C. albicans* e ação sobre fatores de virulência; d) Encapsular em beta-ciclodextrina a fração FE e a substância isolada mais ativa; e) Caracterizar quimicamente e biologicamente os encapsulados, avaliando atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* e citotoxicidade.

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777  
Bairro: Jardim São Demas CEP: 13.245-000  
UF: SP Município: SÃO JOSÉ DOS CAMPOS  
Telefone: (13)3947-9078 Fax: (13)3947-9010 E-mail: ceph@fajc.unesp.br

INSTITUTO DE CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA CAMPUS SÃO  
JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP



Continuação do Parecer: 267.622

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

O estudo não tem riscos, mesmo com o acréscimos de coleta de material de pacientes. Prevê a utilização de cepas clínicas obtidas em estudo anterior (Crastechini et al., 2009 - CEPH 070/2006). A OMS salienta a importância da avaliação dos fitoterápicos para obtenção de evidência consistente com relação à sua segurança e efetividade.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa bem elaborada, bem fundamentada, embasada em estudos atuais e segue linha de pesquisa da autora do projeto.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os termos foram apresentados.

**Recomendações:**

A pesquisadora incluiu coleta de material de indivíduos, o que poderia ter sido feito como emenda.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Projeto aprovado

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O Colegiado aprova o parecer da relatora.

SÃO JOSÉ DOS CAMPOS, 22 de Agosto de 2013

Assinador por:

JANETE DIAS ALMEIDA  
(Coordenador)

Endereço: Av.Engº Francisco José Longo 777  
Bairro: Jardim São Dimas CEP: 12.245-000  
UF: SP Município: SÃO JOSÉ DOS CAMPOS  
Telefone: (13)3547-9078 Fax: (13)3547-9010 E-mail: ceph@tcjc.unesp.br