

RESSALVA

Atendendo solicitação do (a) autor (a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 25/04/2021.

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



***Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland: prospecção químico-biológica do extrato metanólico de escapos no tratamento da candidíase vulvovaginal**

MATHEUS APARECIDO DOS SANTOS RAMOS

Profa. Dra. Taís Maria Bauab
Orientadora

Profa. Dra. Margarete Teresa Gottardo de Almeida
Coorientadora

Araraquara
2019



***Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland: prospecção químico-biológica do extrato metanólico de escapos no tratamento da candidíase vulvovaginal**

MATHEUS APARECIDO DOS SANTOS RAMOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Profa. Dra. Taís Maria Bauab
Orientadora

Profa. Dra. Margarete Teresa Gottardo de Almeida
Coorientadora

Araraquara
2019

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

R175s Ramos, Matheus Aparecido dos Santos.
Syngonanthus nitens (Bong.) Ruhland: prospecção químico-biológica do extrato metanólico de escapos no tratamento da candidíase vulvovaginal / Matheus Aparecido dos Santos Ramos. – Araraquara, 2019.
233 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa em Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Taís Maria Bauab.

Coorientadora: Margarete Teresa Gottardo de Almeida.

1. Candidíase vulvovaginal. 2. Biofilme. 3. *Syngonanthus nitens*. 4. Nano-emulsão. 5. Atividade anti-*Candida albicans*. I. Bauab, Taís Maria, orient. II. Almeida, Margarete Teresa Gottardo de, coorient. III. Título.

CAPES: 40300005

Epígrafe

Em algum lugar além do certo ou errado existe um jardim.

Encontrarei você lá!

(Em memória de José Joaquim dos Santos)

Dedicatória

Dedico este trabalho aos dois seres humanos mais importantes desta minha existência:

Para a minha querida mãe (Fátima Ramos).

Dedicar todo este trabalho em seu nome ainda será pouco perante a gratidão e amor que sinto por você. Minha rainha de cabelos negros e dos olhos saturados de amor, dedico tudo aquilo que sou e tudo aquilo que ainda almejo para minha vida, o amor que levo por ti não tem medida.

Esta luta vencida também é sua.

Para o meu querido Pai (Edivaldo Ramos).

Faltam-me palavras para expressar a emoção que sinto ao dedicar esta Tese também em seu nome. Sua luta e determinação por uma vida melhor sempre foram minha base e minha inspiração. Das suas mãos calejadas e sujas de graxa sairá mais um diploma deste seu filho que nunca se cansará de te orgulhar mais e mais.

Termino esta dedicatória agradecendo a Deus por ter me concebido o privilégio de ser o fruto do amor de vocês.

Com todo esse amor incondicional eu dedico também a minha vida a vocês.

Agradecimento especial

Aqui gostaria de registrar os meus mais puros sentimentos de gratidão para pessoa que foi a peça chave para que este trabalho fosse concluído.

Quero agradecer esta mulher que desde 2012, ao dizer sim a mim, nunca parou de acreditar no meu potencial e sempre seguiu firme na busca por melhorias e oportunidades na evolução da minha carreira.

Repleto de uma emoção sem medida gostaria de prestar meus eternos agradecimentos à **Profa. Dra. Taís Maria Bauab**, minha orientadora, amiga, mãe e conselheira. Uma mulher guerreira, batalhadora e dotada de uma bondade e perseverança que eu jamais havia conhecido.

Como ela mesma costuma dizer, tudo isso é resultado de 50%, sendo estes meus e dela (totalizando 100%). Aqui gostaria de acrescentar que de nada valeria os meus 50% se não fossem valorizados, apostados e principalmente confiados. A senhora sempre foi e sempre será o ideal de profissional que um dia almejo ser!

Obrigado por sempre confiar no meu trabalho e naquilo que sou, e saiba que meu o carinho, respeito e amor por você serão eternos.

Essa vitória é nossa!!!

Agradecimentos

E como eu mesmo costumo dizer, nada se constrói sozinho. Somos fagulhas de luz espalhados neste plano espiritual com missões distintas, mas com um único ideal, evoluir e praticar o exercício da caridade para todos aqueles que cruzem nosso caminho.

“Gostaria de agradecer a todas as pessoas que, de maneira singular, contribuíram para que este trabalho chegasse até aqui”.

Agradeço a Deus, nosso pai, e ao nosso senhor Jesus Cristo que em sua infinita bondade concedeu a mim a habilidade de conduzir este trabalho. Além de serem a base da minha existência e a proteção mais poderosa dos meus dias.

A espiritualidade que me guia para um futuro melhor e move conduz meus passos na busca dos meus ideais.

Aos meus pais **Edivaldo** e **Fátima Ramos**. Deixo aqui gravado os mais puros agradecimentos pela confiança amor e cumplicidade. É impossível mensurar o amor que sinto por vocês.

A minha avó **Matilde dos Santos**. Minha chinezinha com sangue baiano, obrigado por me transmitir esse amor puro e livre de pretensões. Obrigado pelo colo confortável e repleto de amor que vem me aconchegando nestes meus 27 anos de vida. Eu te amo muito!!!

Ao meu avô, **José Joaquim dos Santos** (*in memorian*) que tão repentinamente me deixou neste plano. Mesmo que os dias se transcorram nada será capaz de afagar a saudade que sinto. Emanado num mix de amor e gratidão quero agradecer a Deus por ter me dado o privilégio de receber 27 anos de amor vindo de você, e por permitir que esse amor ultrapasse gerações. Eu sempre serei seu menino e sempre irei carregar esse amor que sinto por ti. Cuide de mim aí de cima e me proteja das emboscadas da vida!

Ao meu avô **Guilhermino Ramos** (*in memorian*) que mesmo após 21 anos de ausência física permanece vivo em meu coração e em minha vida! Quando

fecho os olhos ainda lembro-me de nós dois. Sinto sua proteção e amor aí de cima!!!

A **Nathália Ramos**, minha irmã. Minha princesa falta-me palavras para te agradecer, uma vez que o amor singular que carrego por ti supera todo senso da realidade. Te amo minha irmã, meu presente e meu futuro. Obrigado por sempre dar conta de “tudo” perante toda minha ausência.

Ao meu pedacinho de chão, **Pedro Henrique Ramos Araújo**. Meus eternos agradecimentos a você meu eterno bebê por sempre ser o impulso da minha vida. Nada disso teria sentido se não fosse devido a sua existência. Trilho aqui o meu futuro na intenção de te carregar comigo. Sempre serei seu amigo e seu escudo. O titio te ama demais.

Ao **Carlos Alberto Damas**, que vem me mostrando que a vida é tão sublime a ponto de nunca deixarmos de acreditar no amor. Obrigado pelo carinho de sempre, amor e principalmente pela paciência. Saiba que o sentimento que carrego por ti é o mais puro e livre de pretensões, o que se torna a base de um futuro próspero e cheio das magnitudes imensuráveis dos prazeres da vida. Sempre nosso!!!

A minha irmã de alma, **Luciani Gaspar de Toledo**. Seria necessário parar o tempo por umas cinco gerações no mínimo para que este agradecimento pudesse ser finalizado, uma vez que o amor e cumplicidade devotada a esse anjinho de cabelos loiros é quase que imensurável. Minha irmã, quero te agradecer não somente pelo suporte na execução deste trabalho, mas também pelo amor e cumplicidade que devota a mim ao longo da nossa amizade. Toda minha gratidão e respeito a você minha irmã. Agradeço também a Deus por permitir partilhar parte da minha vida novamente com você neste plano espiritual, pois como sempre dizemos, esse amor é muito grande para ser apenas de uma geração!

Ao meu primo **Robson Zanovello**, pela amizade e por todo amor e compreensão dedicado a mim ao longo desta jornada. E como eu sempre digo, Deus não me deu um privilégio de ter um irmão do sexo masculino, mas te colocou em minha vida para ser meu irmão de alma. Eu te amo primo.

A minha querida amiga **Camila Fernanda Rodero**, um ser humano dotado de uma luz que irradia todos a sua volta. Deixo aqui meus agradecimentos por todos os momentos em que a sua doçura inundou meu coração. Obrigado pela ajuda científica e emocional ao longo desta caminhada. Eu amo você!!!

Ao **Felipe Guioti**, meu grande amigo que Araraquara me presenteou. Ao longo dos anos somos capazes de identificar os presentes que este plano espiritual nos proporciona, e você sem sombra de dúvidas é um deles. Mesmo que uma distância continental insista em nos separar, ainda preservamos essa amizade linda e sem nenhum tipo de pretensão... Obrigado por tudo meu amigo. PS: que falta me faz os nossos cafés nas madrugadas de trabalhos acadêmicos.

Ao **Felipe Hilário**, um tesouro encontrado em Araraquara. Meu amigo, sem dúvida alguma você foi responsável por muitas alegrias ao longo destes anos. Sua amizade é muito importante para mim... Volte logo dos EUA para tomarmos aquela cervejinha regada a muitas risadas e diversão. Amo você Felipinho.

Ao **Anderson Noronha**, meu "pão de queijo mineiro". Obrigado pela ajuda de sempre e pela amizade sincera que carregamos um pelo outro. Guardarei nossas risadas de perder o fôlego pelo resto da minha vida. Nunca se esqueça das palavras desse amigo que te ama muito "não tenha medo, você possui luz própria e muito amor no coração para crescer e vencer na vida".

A **Larissa Spósito**, pela amizade e toda ajuda durante sua trajetória pelo nosso Laboratório. Agradeço pelos momentos felizes e por sempre estar disposta a me ajudar em tudo que fosse necessário. Gratidão!

Ao **Gabriel Davi Marena** (Peão). Meu querido amigo, sua pureza e vontade de vencer na vida são estímulos para que eu continue firme na minha caminhada. Sem sombra de dúvidas você foi um dos melhores presentes que 2018 me trouxe, sempre serei grato pelos conselhos e principalmente pelos ensinamentos... Conte sempre comigo!

A minha coorientada mais recente, **Laura Caminitti de Lima**. Minha flor, não tenho palavras para expressar minha gratidão pela ajuda prestada durante o meu doutorado sanduíche. A vitória desta etapa também é sua. Sua estrela brilha e sempre continuará brilhando. Meu muito obrigado!

Na mesma intensidade de carinho agradeço aos demais amigos presentes e que passaram pelo Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos, meu segundo lar: **Bruna Bonifácio, Bruna Furquim, Giovana Fortunato, Veridiana Gomes, Júlia Hunger, Erina Samezima, Caetano Toshiro, Isadora Masiero, Beatriz Souto** e aos demais que convivi ao longo desta jornada. Meu eterno agradecimento, amor e respeito a vocês.

Ao **Prof. Dr. Marlus Chorilli** por toda ajuda e empenho nas orientações da parte de Farmacotécnica que compuseram o meu Mestrado e agora o meu Doutorado. Adicionalmente agradeço pelos ensinamentos transmitidos durante o Exame Geral de Qualificação de Doutorado desta Tese. Meu eterno respeito e consideração por você.

A **Profa. Dra. Patrícia Bento da Silva** por toda carinho e profissionalismo nos ensaios farmacotécnicos realizados neste trabalho. Meu muito obrigado!

À **Profa. Dra. Margarete Teresa Gottardo** de Almeida, minha coorientadora. Obrigado pelo suporte de sempre e pela ajuda no desenvolvimento do projeto, bem como pelo suporte durante o período do doutorado sanduíche na Holanda. Deixo aqui os mais puros agradecimentos e votos de felicidade.

À **Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos** por toda ajuda que sempre devotou ao meu trabalho e principalmente pela doação do *S. nitens* para que o meu Mestrado e Doutorado fossem desenvolvidos. Meu muito obrigado!

Ao **Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos** e ao doutorando **Fernando Bombarda Oda** por toda ajuda nos ensaios fitoquímicos que compõe este trabalho, além da amizade. Meu muito obrigado!

Ao **Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan** e a **Pós-doutoranda Isabel Cristiane da Silva** pela ajuda nos ensaios de toxicidade realizados neste trabalho.

A todos os amigos, colegas de pós-graduação da FCFAr que encontrei e convivi ao longo destes anos.

Ao **Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins** pela doação da cepa de *L. acidophilus* que foi utilizada neste estudo. Meu muito obrigado.

A **Profa. Dra. Janaína de Cássia Orlandi Sardi** pelo suporte no entendimento dos ensaios transcriptômicos realizados neste trabalho, bem como às suas contribuições no Exame Geral de Qualificação de Doutorado desta Tese.

As técnicas da Microbiologia da FCFAR: **Edinéia, Débora, Sílvia e Marisa**. Minhas lindas, não tenho palavras para agradecer por todo suporte devotado a mim ao longo desta trajetória. Meus eternos agradecimentos à vocês.

À secretaria do DCB **Margarete Rossi** por todo suporte de sempre e pela amizade e alegria sempre transmitidas à mim ao longo destes anos. Muito obrigado Marga!!!

A todos os amigos do Laboratório de Micologia Médica da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto-FAMERP, em especial à **Nathalia Brizzotti** por toda ajuda sempre foi devotada a mim.

À **Joselma Baptista**, técnica do Laboratório de Saúde Pública da FCFAR pela doce companhia e amor que sempre foi transmitido a mim.

Aos meus doces amigos **Ana Paula Barreto** e **Giovani Jacomini**. Agradeço pelo carinho e amor incondicional. Em especial agradeço também pelo “pacotinho” que vocês me deram, meu sobrinho **Joaquim Barreto Jacomini**, um raiozinho de sol que me enche de amor e alegria. Eu amo vocês meus amigos.

A **Amábili Batista** e **Silvana Barreto**, minhas amigas que sempre estão de braços abertos para me receber e me encher de amor e muitas risada. Amo muito vocês e agradeço muuuuito por toda reciprocidade dessa amizade tão linda e repleta de realizações.

Ao **Prof. Dr. Hendrik Jan Busscher** meu supervisor do Doutorado Sanduíche em Groningen - Holanda (2017-2018) e também à minha Co-supervisora **Profa. Dra. Henny Van der Mei**. Agradeço por todos os ensinamentos transmitidos a mim e pela oportunidade de conhecer um mundo científico novo e totalmente diferente do que já havia vivido. Levarei este país maravilhoso para sempre em meu coração.

A todos os amigos que encontrei durante o período do doutorado sanduíche na **University Medical Center Groningen – UMCG**. Deixo aqui um agradecimento especial aos meus preciosos colegas de office do BME-UMCG, os

quais partilhamos momentos de muita alegria e felicidade durante o ano todo: **Damla Keskin, Yan Yan Wu, Ruifang Gao, Colin Rosman, Zhiwei Cui, Yori Ong, Derly Tescaro e Liu Yong**. Vocês fizeram este ano ainda mais especial.

A **Thaís Pereira e Mari Miura**, meus tesouros brasileiros que encontrei na Holanda. Sem sombra de dúvidas a Holanda teve um gostinho mais especial na presença de vocês, e não existem palavras capazes de expressar a minha gratidão, respeito e a admiração que sinto por vocês. Obrigado pela amizade e pelos finais de semanas regados de alegria e muito café no quarto E1.8 do Frascati Student Housing.

A todos os funcionários do Biomedical Engineering Department – UMCG, os quais me acolheram com muito profissionalismo e dedicação, em especial, agradeço o meu Lab coaching **Willem Woudstra**, por todo suporte na execução do meu trabalho.

Deixo um agradecimento especial aos técnicos laboratoriais **Willy De Visser, Jelly Atema-Smith, Reinier de Bron, Betsy Van der Belt, Jop de Vries e Minnie H.** Vocês foram essenciais para que muitos dos experimentos realizados fossem concluídos com sucesso. Minha eterna gratidão!

A doce secretária do BME-UMGC **Ina Hidelma**, uma mulher incrível e com um coração holandês cheio de amor brasileiro para oferecer. Por onde quer que a vida me leve sempre guardarei seus conselhos e o doce “*Goede morgen*” que trocávamos todas as manhãs.

A todos os integrantes da **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP**. Minha gratidão por todos os funcionários desta instituição será eterna.

A **todos os funcionários da Seção de Pós-graduação da FCFAr**, em especial à **Claudia Lúcia Molina** pelo profissionalismo e carinho dedicado a mim.

A **equipe de limpeza da FCFAr** que não medem esforços para deixar o nosso ambiente de trabalho ainda melhor. Em especial, agradeço as funcionárias **Marta (Martinha), Nice e Edna** por todo carinho e amor dedicado ao nosso laboratório ao longo da minha jornada.

À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas** de Araraquara-FCFAR enquanto Instituição.

Ao **Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico** da FCFAR pelo Auxílio Publicação recebido.

A **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP** pela concessão da bolsa de Doutorado no país (**Processo: 2014/24626-9**) e no exterior (**Processo BEPE: 2016/17109-3**), e Auxílios Regulares de Apoio à Pesquisa (**Processo 2013/25432-0 e Processo 2016/08559-5**) e Auxílios de Publicação de Artigos Científicos (**Processo 2016/13784-8 e Processo 2018/21626-9**).

RESUMO

A elevada incidência de casos infecciosos causada por *C. albicans*, tal como a candidíase vulvovaginal (CVV) expõe o ser humano a terapias agressivas, bem como implica no desenvolvimento da resistência aos antifúngicos disponíveis na terapêutica clínica. Neste sentido, diversos pesquisadores encontram na natureza, bem como em plataformas nanotecnológicas de liberação de fármacos, um novo horizonte para disponibilizar novos recursos que possibilitem compor o arsenal terapêutico das doenças fúngicas. Em vista disso, este trabalho visou avaliar o potencial antifúngico *in vitro* e *in vivo* de frações do extrato metanólico de escapos de *Syngonanthus nitens*, o qual vem se mostrando promissor no tratamento da CVV, não incorporado e incorporado em um sistema nanoestruturado de liberação de fármacos (nanoemulsão lipídica - NE) buscando aprimorar os parâmetros referentes à biodisponibilidade das mesmas. Os ensaios investigativos foram iniciados com o fracionamento do extrato bruto (extração em fase sólida) e caracterização química das frações (ensaios cromatográficos por CCD e CLAE-DAD), seguido para o desenvolvimento da NE, a qual foi composta por colesterol (fase oleosa), Brij 58 (tensoativo) e tampão fosfato pH 7,4 + 0,25% de dispersão de quitosana (fase aquosa). 12 frações foram obtidas e apresentaram perfis químicos e antimicrobianos distintos, dentre elas, a fração Fr3 foi a mais promissora e constatou-se que o flavonóide luteolina é o composto majoritário e o responsável pela atividade antimicrobiana observada. Os ensaios farmacotécnicos (elaboração do diagrama de fases, microscopia de luz polarizada, dispersão por luz dinâmica, potencial zeta, ensaios de estabilidade, estudo reológico contínuo e oscilatório) permitiram selecionar duas formulações (F1 e F9) que foram empregadas como plataforma de liberação e administração do extrato bruto e da Fr3 (F1 EXT, F9 EXT, F1 Fr3 e F9 Fr3). A caracterização farmacotécnica mostrou que estas formulações possuem propriedades aceitáveis para a incorporação de fármacos, bem como para a administração por via intravaginal. As análises biológicas *in vitro* (determinação da CIM, potencial anti-biofilme, interferência na adesão de *C. albicans* sobre superfície em condições de fluxo, influência dos tratamentos sobre os genes ALS3, CDR1, CDR2 e ERG 11 em biofilmes maduros associados com a CVV e ensaios de toxicidade celular e em modelo de *A. salina*) bem como a determinação físico-química das amostras adsorvidas à superfície (determinação no ângulo de contato da água e XPS) foram realizadas com as amostras vegetais incorporadas e não incorporadas. Adicionalmente, um ensaio terapêutico experimental *in vivo* de CVV foi realizado com a fração Fr3 livre e incorporada em F9 (F9 Fr3). Os resultados das análises biológicas mostraram que as formulações foram capazes de potencializar a atividade biológica dos compostos vegetais no que se diz respeito ao potencial inibitório (diminuição dos valores de CIM para células planctônicas potencialização da inibição de biofilmes monotípicos e heterotípicos), adicionalmente, foi verificado que a utilização de F1 EXT, F9 EXT, F1 Fr3 e F9 Fr3 interferem na adesão de *C. albicans* sobre superfícies em condições de fluxo, bem como promovem alterações na expressão de genes associados com a adesão, resistência antifúngica e biossíntese do ergosterol. A utilização da Fr3 livre e F9 Fr3 exerceram comportamento terapêutico sobre ratas que estavam em processo de CVV agudo, entretanto, uso do derivado vegetal incorporado em F9 mostrou-se superior. Em suma, os resultados obtidos até o momento mostram a potencialidade antifúngica *in vitro* e *in vivo* de derivados de *S. nitens* não incorporados e incorporados em uma NE. O trabalho será continuado empregando novas abordagens investigativas que permitirão avaliar a ação dos derivados vegetais sobre outras espécies de *Candida* associadas com a CVV.

Palavras-chave: Candidíase vulvovaginal. Biofilme. *Syngonanthus nitens*. Nanoemulsão. Atividade anti-*Candida albicans*.

ABSTRACT

The incidence of infectious diseases caused by *C. albicans*, such as vulvovaginal candidiasis (CVV) exposes humans to aggressive therapies, and to the development of resistance to antifungal agents available in clinical therapy, as well. In this sense, several researchers find in the nature, and in the nanotechnology platforms for drug delivery, a new horizon to make available new resources that allow to compose the therapeutic arsenal of fungal diseases. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* and *in vivo* antifungal potential of fractions from the methanolic extract of *Syngonanthus nitens*, which has been shown to be promising in the treatment of CVV, not incorporated and incorporated in a nanostructured drug delivery system (lipid nanoemulsion - NE) aiming to improve the parameters related to the bioavailability. The investigations were initiated with the fractionation of the crude extract (solid phase extraction) and chemical characterization of the fractions (TLC and HPLC-DAD chromatographic analyzes), followed for the development of the NE, which was composed by cholesterol (oil phase), Brij 58 (surfactant) and phosphate buffer pH 7.4 + 0.25% chitosan dispersion (aqueous phase). 12 fractions were obtained and presented distinct chemical and antimicrobial profiles, among them, the Fr3 fraction was the most promising and it was verified that the flavonoid luteolin is the majoritarian compound and responsible for the antimicrobial activity. Pharmacotechnical experiments (phase diagram design, polarized light microscopy, dynamic light scattering, zeta potential, stability evaluations, continuous and oscillatory rheological study) allowed us to select two formulations (F1 and F9) that were used as a release platform and administration of the crude extract and Fr3 (F1 EXT, F9 EXT, F1 Fr3 and F9 Fr3). The pharmacotechnical characterization showed that these formulations have acceptable properties for drug incorporation and for as well as for vaginal delivery. *In vitro* biological analyzes (MIC determination, anti-biofilm potential, interference on *C. albicans* adhesion on surface under flow conditions, influence of the treatments on ALS3, CDR1, CDR2 and ERG 11 genes in mature biofilms associated with CVV and cell and toxicity tests on *A. salina* model) and the physico-chemical determination of surface adsorbed samples (determination of water contact angle and XPS) were performed with the incorporated and unincorporated vegetal samples. In addition, an experimental *in vivo* therapeutic trial of CVV was performed with the free Fr3 and incorporated into F9 (F9 Fr3). The results of the biological analyzes showed that the formulations were able to increase the biological activity of the vegetal compounds according to the inhibitory potential (decrease of MIC values for planktonic cells potentiation of the inhibition of monotypic and heterotypic biofilms), additionally, that the use of F1 EXT, F9 EXT, F1 Fr3 and F9 Fr3 can interfere in the adhesion of *C. albicans* on surfaces under flow conditions, and promote changes in the expression of genes associated with adhesion, antifungal resistance and ergosterol biosynthesis as well. The use of free Fr3 and F9 Fr3 exerted therapeutic behavior on rats that were in the process of acute CVV, however, use of the vegetal derivative incorporated into F9 was superior. In summary, the results obtained so far showed the *in vitro* and *in vivo* antifungal potential of *S. nitens* derivatives not incorporated and incorporated into NE. The work will be continued using new investigative approaches that will allow to evaluate the action of the vegetal derivatives on other species of *Candida* associated with the CVV.

Keywords: Vulvovaginal candidiasis. Biofilm. *Syngonanthus nitens*. Nanoemulsion. anti-*Candida albicans* activity.

1. INTRODUÇÃO

Desde os primórdios da civilização, o homem apresenta uma grande preocupação com as doenças infecciosas que crescem exponencialmente, e estão diretamente ligadas a altos índices de morbidade e mortalidade. O número de quadros clínicos infecciosos classifica-se como um problema de saúde pública que atinge todos os seres humanos independentemente da condição social ou posição geográfica. Entretanto, é conhecido o fato de que países subdesenvolvidos que possuem baixas condições de higiene sanitária, déficit no sistema público na promoção de campanhas de conscientização e boas práticas sanitárias, são mais propensos ao desenvolvimento de determinados tipos de infecções quando em comparação com países desenvolvidos (LEVENTHAL et al., 2015).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) o desencadeamento de doenças e principalmente as manifestações clínicas oriundas pelo contágio de micro-organismos de caráter patogênico e oportunista ocupam a segunda posição no ranking de doenças que levam a morte dos seres humanos, ficando atrás somente das doenças de origem neoplásica (ABAT et al., 2016).

De maneira geral, a habilidade em desencadear processos patológicos é exercida pela maioria dos micro-organismos, entretanto, nos últimos anos tem-se dado especial atenção aos estados patológicos desencadeados por fungos. Ainda que as infecções fúngicas não sejam tão frequentes quanto as infecções bacterianas ou virais, elas representam uma parcela importante das doenças infecciosas, colaborando com o aumento do número de novos casos de infecciosos agudos e crônicos nas últimas décadas (HUFFNAGLE; NOVERR, 2013; NETEA et al., 2015).

Em sua totalidade, os fungos leveduriformes e filamentosos são agentes etiológicos de um amplo espectro de doenças que variam desde infecções leves superficiais que afetam 1,7 bilhão de indivíduos em todo o mundo, até quadros clínicos mais severos de infecções invasivas que ocasionam a morte de aproximadamente 1,5 milhão de seres humanos por ano. Entretanto, os dados epidemiológicos disponíveis para quantificar e diagnosticar as infecções fúngicas são escassos devido à falta de padrões adequados para relatar os diversos quadros clínicos associados a presença destes micro-organismos, o que gera muitas vezes em um diagnóstico incorreto. Assim, os patógenos fúngicos provavelmente contribuem ainda mais para a morbidade e mortalidade humana do que as estimativas atuais indicam (SPITZER; ROBBINS; WRIGHT, 2017).

As infecções por fungos patogênicos surgiram nas últimas décadas como uma crescente ameaça global para a saúde humana. De maneira geral, os fungos desencadeiam processos infecciosos de natureza oportunista, principalmente em pacientes que possuem algum déficit no

sistema imunológico, tais como os infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou como consequência de avanços médicos modernos como o uso de quimioterápicos de maneira terapêutica ou profilática, transplante de órgãos, implantação de dispositivos médicos sintéticos, ou mesmo aqueles que possuem doenças de base como o lúpus, diabetes entre outras (BROWN et al., 2012).

Dentre a vasta variedade de fungos oportunistas promotores de diversos estados patológicos nos seres humanos destacam-se os pertencentes ao gênero *Candida*. Este gênero constitui-se aproximadamente 200 diferentes espécies de fungos leveduriformes, que quase em sua totalidade habitam os mais diversos nichos corporais, tais como a orofaringe, cavidade bucal, dobras da pele, mucosa vaginal além de secreções brônquicas, vaginais e também na urina e fezes. (MAYER; WILSON; HUBE, 2013).

Dentre as espécies presentes neste gênero, encontra-se a levedura *Candida albicans* um fungo dimórfico (capacidade de diferir-se em levedura e pseudohifas e hifas verdadeiras) que possuem naturalmente a habilidade de colonizar nichos corporais tais como a mucosa digestiva e vaginal. Devido a esta característica é classificada como a espécie mais prevalente em casos de infecções vaginais, e está diretamente relacionada episódios de recidiva infecciosa e o desencadeamento de infecções sistêmicas (CASSONE; SOBEL, 2016). Por sua vez, reporta-se a expressiva capacidade de infestação que esta levedura possui, no sentido de que um número limitado de estirpes de *C. albicans* podem colonizar ao mesmo tempo, uma, ou várias membranas e mucosas de um mesmo indivíduo (NOBILE; JOHNSON, 2015).

A candidíase vulvovaginal (CVV) é classificada como a doença mais comum ocasionada por leveduras do gênero *Candida*, na qual, a espécie *C. albicans* predominantemente é responsável por cerca de 80% dos casos (SOBEL, 2015), entretanto, 20% dos casos são desencadeados por outras espécies, as quais são classificadas como leveduras não-*albicans*, tais como *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (WHALEY et al., 2017). Além disso, os episódios de candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR) são a causa mais comum de morbidade em mulheres e predis põe o desenvolvimento de neoplasias na região cervical (GEMMILL et al., 2010).

A complexidade envolvida na dinâmica da CVV desperta interesse na comunidade científica em investigar as possíveis causas que levam à persistência e disseminação de quadros infecciosos agudos e crônicos que além de levarem a uma serie de desconfortos, expõem mulheres de todos as faixas etárias a um em elevado grau de risco ao desenvolvimento da CVVR, predispondo-as à manifestações clinicas mais severas (CAMPION; KULLBERG; ARENDRUP, 2015).

De maneira geral, e não somente em eventos relacionados com a CVV, os episódios infecciosos agudos, que em sua maioria são desencadeados por células microbianas em forma planctônica têm sido combatidos com o uso de vacinas e antibióticos, no entanto, assim como todo

ser vivo, os micro-organismos desenvolvem estratégias para garantir sua sobrevivência e adaptação ao stress ambiental, sendo assim, cooperam-se entre si desenvolvendo uma coesa e robusta comunidade de células com forte comunicação intercelular, assim denominado de biofilme (FUX et al., 2005; SARDI et al., 2014; NETT; ANDES, 2015).

A ciência moderna classifica os biofilmes microbianos como um sistema biológico formado por comunidades heterogêneas (diversidade de espécies, ex. bactérias e fungos vivendo em simbiose) de células microbianas agregadas, organizadas e funcionais embebidas em matriz extracelular composta por substâncias poliméricas produzidas pelas próprias células, a qual possibilita a aderência irreversível a superfícies bióticas ou abióticas. Além disso, algumas propriedades importantes devem ser consideradas, como a taxa de crescimento microbiano alterada e o fato de que os micro-organismos em biofilme transcrevem genes com padrão diferenciado daqueles observado em células planctônicas (BJARNSHOLT, 2013; BURMØLLE et al., 2014).

Devido tratar-se de estruturas tridimensionais dotadas de diversos tipos de mecanismos de defesa e adaptação, não é de se surpreender que a terapêutica e erradicação dos biofilmes seja complexa. Alguns mecanismos de resistência atribuídos as células que se encontram na forma sésil proporcionam condições favoráveis de sobrevivência e reprodução, o que as torna menos suscetíveis à erradicação quando comparadas aos mesmos micro-organismos sob a forma planctônica (RAMAGE et al., 2012). A incidência de infecções causadas por biofilmes microbianos tornou-se um problema crescente para os sistemas de saúde e para sociedade, neste sentido, existe um esforço contínuo da indústria farmacêutica para o desenvolvimento de novos produtos para o tratamento de infecções resistentes, uma vez que existe um número limitado de agentes eficazes contra biofilmes (RAMOS et al., 2018).

No cenário atual, a descoberta de medicamentos antimicrobianos que sejam eficazes no tratamento de doenças de origem microbiana é ainda é classificado como uma área desafiadora na medicina moderna, uma vez que infelizmente não consegue acompanhar a desenfreada evolução dos micro-organismos no que se relaciona ao aumento dos perfis de resistências aos medicamentos disponíveis na prática clínica. No que se diz respeito aos fármacos antifúngicos, nos últimos 30 anos, apenas uma nova classe de medicamento foi introduzida no mercado e conseqüentemente na rotina clínica de centros médicos e hospitais, sendo esta as chamadas equinocandinas (SPITZER; ROBBINS; WRIGHT, 2017).

Em vista do cenário atual, pesquisadores de todo o mundo desenvolvem novas estratégias de combate e controle de doenças microbianas e permanecem firmes na busca por novas fontes de moléculas bioativas com aplicabilidade antimicrobiana e que exerçam a ação farmacológica de maneira eficaz, e com baixos índices de efeitos secundários. Baseando-se nestas ideias, a ciência moderna encontra na biodiversidade o suporte necessário para que pesquisas clínico-farmacológicas

sejam desenvolvidas todos os anos e novas abordagens terapêuticas sejam introduzidas à sociedade, servindo de suporte e fonte de disseminação de informações relacionadas principalmente ao potencial farmacológico de produtos naturais, tais como as plantas medicinais (CRAGG; PEZZUTO, 2016).

Devido serem dotados de uma imensa diversidade estrutural e química, os produtos naturais continuam a inspirar novas moléculas em áreas da ciência como química, biologia e medicina. Visto a grande variedade e possibilidade de aprimoramento em termos químicos, diversas moléculas são otimizadas evolutivamente semelhantemente aos fármacos sintéticos, e devido a isso, continuam sendo as melhores fontes de drogas e novos protótipos de fármacos (CRAGG; NEWMAN, 2013; SHEN, 2015).

A Etnofarmacologia classifica-se como a grande aliada na busca de novos compostos naturais com a atividade biológica, facilitando o acesso à ampla diversidade de famílias botânicas que possuem naturalmente constituintes químicos importantes que podem ser utilizados na elucidação de novos compostos com atividade antimicrobiana, a exemplo, destaca-se o conhecimento sobre as propriedades de plantas pertencentes a família Eriocaulaceae, a qual é composta por mais de 1200 espécies de monocotiledôneas incomuns predominantemente encontradas nos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço – no estado de Minas Gerais e também da Serra do Jalapão no Estado do Tocantins. Esta família destaca-se não só pela grande riqueza especificamente observada, mas também pelo elevado número de táxons endêmicos desta formação geológica além dos estudos relacionados com o perfil antimicrobiano e fitoquímico (ANDRADE et al., 2010; PACIFICO et al., 2011; GIULIETTI et al., 2012; RAMOS et al., 2016).

A espécie *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland é um exemplo de planta pertencente a esta família que vem ganhando destaque na área científica no que se diz respeito ao seu potencial antimicrobiano e perfil químico. Esta espécie possui uma ampla variedade de constituintes químicos que estão diretamente associados com a atividade antimicrobiana. O estudo realizado por Pacífico et al. (2011) avaliou a composição química do extrato metanólico de escapos encontrando uma ampla diversidade de metabólitos secundários tais como 17 compostos, entre flavonas e xantonas, incluindo 6 novas moléculas, o que colaborou para a ampliação de estudos biológicos da espécie abrindo novos horizontes para a verificação do potencial biológico desta espécie vegetal.

No ano seguinte, em um estudo quantitativo de flavonoides, naftopirranonas e xantonas de espécies da família Eriocaulaceae, foi verificado a presença do flavonóide luteolina como sendo um dos componentes majoritário do extrato metanólico de escapos de *S. nitens*, o que corroborou para que estudos biológicos utilizando o extrato vegetal fossem desenvolvidos a fim de fornecer aplicações terapêuticas para espécie em questão (ANDREA et al., 2012). A presença deste flavonóide é de grande interesse em investigações de produtos naturais com atividade

antimicrobiana, uma vez que o mesmo possui atividade antimicrobiana comprovada na literatura científica contra diversas espécies de bactérias patogênicas (SHEN et al., 2014).

Após estes estudos, investigações biológicas relacionadas com o potencial biológico de *S. nitens* foram iniciadas, tais como importantes resultados referentes ao potencial estrogênico (OLIVEIRA et al., 2013), avaliação do potencial antifúngico contra espécies de *Candida* (RAMOS, 2015) potencial profilático contra CVV desencadeada por *C. krusei* (RAMOS et al., 2015) e ainda a caracterização do potencial terapêutico da CVV causadas por cepas de *C. albicans* resistentes ao fluconazol em modelo experimental in vivo em roedores utilizado o extrato metanólico de escapos incorporados em um sistema líquido cristalino mucoadesivo (RAMOS et al., 2016).

Os estudos biológicos realizados com o extrato metanólico de *S. nitens* são promissores e estimulam a busca por alternativas que possam aumentar a potencialidade deste composto vegetal no que se diz respeito ao aprimoramento dos parâmetros farmacológicos, neste sentido, a busca por ferramentas tais como a nanotecnologia farmacêutica mostra-se de grande impacto e importância.

O uso de sistemas nanoestruturados para promover a liberação e veiculação de princípios bioativos é consagrado na literatura científica (QIN et al., 2017). A aplicabilidade de sistemas nanoestruturados de liberação de fármacos tais como as nanomeulsões, microemulsões, nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas sólidas, lipossomas e cristais líquidos, vai muito além de otimizar a solubilização de compostos, uma vez que a veiculação nestes sistemas prometem potencializar o potencial terapêutico dos mesmos, o que classifica-se como uma estratégia para otimizar a atividade antimicrobiana de diversos tipos de produtos naturais, bem como os derivados vegetais (BONIFÁCIO et al., 2014).

A exemplo destes sistemas destacam-se as nanoemulsões lipídicas, as quais tem se mostrado como um promissor sistema de liberação de fármacos (ALANAZI et al., 2014). Estes sistemas caracterizam-se como uma dispersão heterogênea de dois líquidos imiscíveis (óleo em água ou água em óleo) possuindo um tamanho médio de gotículas variando de 50-200 nm. As nanoemulsões também podem ser chamadas de nanomicelas ou nanopartículas micelares que são estabilizadas usando surfactantes, também conhecidos como tensoativos. Adicionalmente, a utilização destes sistemas vai além do seu perfil como agente veiculador de princípios bioativos, recentemente, as nanoemulsões vem sendo amplamente utilizadas para fins diagnósticos, imagens e terapia do câncer, especialmente devido às suas propriedades favoráveis para solubilizar eficientemente medicamentos solúveis em água, biocompatibilidade, alta estabilidade *in vitro* e *in vivo* e sua capacidade de acumulação em áreas patológicas com vasculatura defeituosa (MAHATO, 2017).

Em vista da aplicabilidade deste importante sistema de liberação de fármacos, estima-se que o seu emprego como agente veiculador de derivados de *S. nitens* possa ser uma alternativa

interessante no que se diz respeito ao tratamento da CVV, uma vez que estes sistemas já foram descritos na literatura como veículos potenciadores de princípios ativos por via intravaginal (SILVA et al., 2014). Sendo assim, a proposta deste trabalho mostra-se válida e de importante aplicabilidade para a pesquisa de uma nova alternativa para o tratamento desta doença.

2. CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados e discutidos neste documento é possível concluir que:

- ✚ O fracionamento do extrato bruto de *S. nitens* possibilitou obter 12 diferentes frações;
- ✚ As frações oriundas do extrato de *S. nitens* possuem perfis químicos distintos;
- ✚ As frações oriundas do extrato de *S. nitens* possuem diferentes perfis de atividade antimicrobiana contra cepas de *C. albicans*;
- ✚ A fração Fr3 é a amostra mais ativa contra *C. albicans*;
- ✚ O flavonóide luteolina é o composto majoritário da fração Fr3 e o responsável pela atividade antifúngica encontrada;
- ✚ A fração Fr3 possui maior seletividade de ação para cepas fúngicas;
- ✚ Os componentes utilizados para compor o novo sistema nanotecnológico de liberação de fármacos foram capazes de criar estruturas em ordem de nanômetros caracterizando formulações nanoemulsionadas (nanoemulsão);
- ✚ As formulações F1 e F9 foram as mais estáveis e aplicáveis ao desenvolvimento dos ensaios biológicos que compuseram este trabalho;
- ✚ Os ensaios farmacotécnicos de caracterização mostraram que as formulações possuem características favoráveis e aceitáveis para administração vaginal, bem como estabilidade aceitável;
- ✚ A fração Fr3 possui atividade contra biofilmes monotípicos de *C. albicans*;
- ✚ As formulações F1 e F9 potencializaram a ação inibitória de Fr3 sobre células planctônicas e biofilmes monotípicos de *C. albicans*;
- ✚ As formulações F1 e F9 potencializaram a ação inibitória de Fr3 sobre células planctônicas de cepas de *Candida não-albicans*;
- ✚ O mecanismo de ação de EXT e Fr3 livres e incorporados em F1 e F9 podem estar relacionados com a permeabilidade de íons à membrana de *C. albicans*;

- ✦ Os derivados vegetais (extrato bruto e Fr3) não incorporados e incorporados em F1 e F9 possuem a capacidade de interferir à adesão de *C. albicans* em superfície sobre condições de fluxo hidrostático;
- ✦ Os derivados vegetais não incorporados e incorporados possuem a capacidade de promover modificações físico-químicas sobre a superfície empregada como substrato de adesão (vidro);
- ✦ O extrato e a fração Fr3 possuem ação superior contra biofilmes monotípicos de *G. vaginalis* em comparação com *L. acidophilus*;
- ✦ O extrato e a fração Fr3 possuem ação contra biofilmes heterotípicos associados com a CVV (*C. albicans* + *G. vaginalis* e *C. albicans* + *L. acidophilus*);
- ✦ A incorporação do extrato e Fr3 das formulações F1 e F9 promoveu o aumento do perfil inibitório de ambos sobre todos os biofilmes testados;
- ✦ Os tratamentos empregando o extrato e Fr3 não incorporados e incorporados em F1 e F9 possuem interfere de diferentes maneiras na expressão de ALS3, CDR1, CDR2 e ERG11 sobre biofilmes de *C. albicans*, *C. albicans* + *G. vaginalis* e *C. albicans* + *L. acidophilus*;
- ✦ O extrato e a fração Fr3 (incorporados e não incorporados) possuem perfis de citotoxicidade *in vitro* aceitáveis contra as linhagens HeLa, Vero e HaCat;
- ✦ O extrato e a fração Fr3 (incorporados e não incorporados) mostraram baixa toxicidade frente ao modelo experimental de *Artemia salina*;
- ✦ A fração Fr3 foi terapeuticamente ativa no ensaio *in vivo* de CVV;
- ✦ A ação terapêutica da fração Fr3 foi potencializada após a incorporação em F9.

3. REFERÊNCIAS

- ABAT, C. et al. Traditional and syndromic surveillance of infectious diseases and pathogens. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 48, n. July 1976, p. 22–28, 2016.
- ALANAZI, F. K. et al. Potential of lipid nanoemulsion for drug delivery of cholesteryl-hexahydrophthaloyl-5-fluorouracil. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 24, n. 5, p. 459–463, 2014.
- ANDRADE, M. J. G. DE et al. A comprehensive phylogenetic analysis of Eriocaulaceae: Evidence from nuclear (... **Taxon**, v. 59, n. 2, p. 379–388, 2010.
- ANDREA, C. et al. Quantification of Flavonoids , Naphthopyranones and Xanthonnes in Eriocaulaceae Species by LC-PDA. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 3, n. February, p. 138–146, 2012.
- BJARNSHOLT, T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. **APMIS**, v. 121, n. 136, p. 1–58, maio 2013.
- BONIFÁCIO, B. V. et al. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: A review. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2013.
- BROWN, G. D. et al. Hidden Killers: Human Fungal Infections. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 165, p. 165rv13-165rv13, 2012.
- BURMØLLE, M. et al. Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter? **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 2, p. 84–91, fev. 2014.
- CAMPION, E. W.; KULLBERG, B. J.; ARENDRUP, M. C. Invasive Candidiasis. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 15, p. 1445–1456, out. 2015.
- CASSONE, A.; SOBEL, J. D. Experimental models of vaginal candidiasis and their relevance to human candidiasis. **Infection and Immunity**, v. 84, n. 5, p. 1255–1261, 2016.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, 2013.
- CRAGG, G. M.; PEZZUTO, J. M. Natural Products as a Vital Source for the Discovery of Cancer Chemotherapeutic and Chemopreventive Agents. **Medical Principles and Practice**, v. 25, n. 2, p. 41–59, 2016.
- DE OLIVEIRA, A. P. S. et al. Estrogenic and chemopreventive activities of xanthonnes and flavones of *Syngonanthus* (Eriocaulaceae). **Steroids**, v. 78, n. 11, p. 1053–1063, 2013.
- DOS SANTOS RAMOS, M. A. et al. *Syngonanthus nitens* Bong. (Rhul.)-loaded nanostructured system for Vulvovaginal candidiasis treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 8, 2016.
- FUX, C. A. et al. Survival strategies of infectious biofilms. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 34–40, 2005.

- GEMMILL, J. A. L. et al. Cancers, infections, and endocrine diseases in women with endometriosis. **Fertility and Sterility**, v. 94, n. 5, p. 1627–1631, out. 2010.
- GIULIETTI, A. M. et al. Molecular phylogeny, morphology and their implications for the taxonomy of Eriocaulaceae. **Rodriguesia**, v. 63, n. 1, p. 1–19, 2012.
- HUFFNAGLE, G. B.; NOVERR, M. C. The emerging world of the fungal microbiome. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 7, p. 334–341, 2013.
- LEVENTHAL, G. E. et al. Evolution and emergence of infectious diseases in theoretical and real-world networks. **Nature communications**, v. 6, p. 6101, 2015.
- MAHATO, R. Nanoemulsion as Targeted Drug Delivery System for Cancer Therapeutics. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Pharmacology**, v. 3, n. 2, p. 83–97, 2017.
- MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119–128, fev. 2013.
- NETEA, M. G. et al. Immune defence against *Candida* fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 10, p. 630–642, 2015.
- NETT, J. E.; ANDES, D. R. Fungal Biofilms: In Vivo Models for Discovery of Anti-Biofilm Drugs. In: **Microbial Biofilms, 2nd Edition**. [s.l.] American Society of Microbiology, 2015. v. 3p. 33–49.
- NOBILE, C. J.; JOHNSON, A. D. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. **Annual Review of Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 71–92, out. 2015.
- PACIFICO, M. et al. Metabolite fingerprint of “capim dourado” (*Syngonanthus nitens*), a basis of Brazilian handicrafts. **Industrial Crops and Products**, v. 33, n. 2, p. 488–496, 2011.
- QIN, S. Y. et al. Drug self-delivery systems for cancer therapy. **Biomaterials**, v. 112, p. 234–247, 2017.
- RAMAGE, G. et al. Fungal Biofilm Resistance. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, p. 1–14, 2012.
- RAMOS, M. A. S. et al. Liquid crystal precursor mucoadhesive system as a strategy to improve the prophylactic action of *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland against infection by *Candida krusei*. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 7455–7466, 2015.
- SARDI, J. D. C. O. et al. Highlights in pathogenic fungal biofilms. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 31, n. 1, p. 22–29, jan. 2014.
- SHEN, B. A New Golden Age of Natural Products Drug Discovery. **Cell**, v. 163, n. 6, p. 1297–1300, 2015.
- SHEN, X. FEI et al. Luteolin decreases the attachment, invasion and cytotoxicity of UPEC in bladder epithelial cells and inhibits UPEC biofilm formation. **Food and Chemical Toxicology**, v. 72, p. 204–211, 2014.

SILVA, P. B. et al. Nanotechnological Strategies for Vaginal Administration of Drugs—A Review. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 10, n. 9, p. 2218–2243, set. 2014.

SOBEL, J. D. Recurrent vulvovaginal candidiasis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 28, n. 12, p. 93–95, jul. 2015.

SPITZER, M.; ROBBINS, N.; WRIGHT, G. D. Combinatorial strategies for combating invasive fungal infections. **Virulence**, v. 8, n. 2, p. 169–185, 2017.

WHALEY, S. G. et al. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-*albicans* *Candida* Species. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. JAN, p. 1–12, 2017.