



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Araraquara

**Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, UNESP**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

**BRUNA VIDAL BONIFÁCIO**

**Prospecção químico-biológica de extratos hidroetanólicos das folhas de**  
***Astronium urundeuva* na investigação do potencial antifúngico**

**ARARAQUARA – SP**

**2018**

**BRUNA VIDAL BONIFÁCIO**

**Prospecção químico-biológica de extratos hidroetanólicos das folhas de  
*Astronium urundeuva* na investigação do potencial antifúngico**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Microbiologia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

**Orientadora:** Profa. Dra. Taís Maria Bauab

**ARARAQUARA – SP**

**2018**

**Ficha Catalográfica**

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

**B715p** Bonifácio, Bruna Vidal  
Prospecção químico-biológica de extratos hidroetanólicos das folhas de *Astronium urundeuva* na investigação do potencial antifúngico / Bruna Vidal Bonifácio. – Araraquara, 2018.  
132 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 e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos (Microbiologia).

Orientadora: Tais Maria Bauab.

1. *Astronium urundeuva* (Allemão) Engl. 2. Fitoquímica. 3. Atividade antifúngica. 4. *Candida* sp.  
5. Candidíase vulvovaginal. 6. Biofilme. 7. *Checkerboard*. 8. Experimento de passagem seriada.  
9. *Artemia salina* L. I. Bauab, Tais Maria, orient. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada por Maria Irani Colto CRB-8/4.440

**CAPES: 40300005**

*Dedico este trabalho aos meus pais Sandra e Sidinei...*

*“Não acredito que serei capaz de agradecer por tudo que seria necessário... Simplesmente decidi direcionar meu primeiro **OBRIGADO** a vocês por simplesmente serem meus pais. Afinal, não estaria aqui se não fosse pelo desejo, pelos planos e por todo o esforço que tiveram para que eu estivesse aqui! Meu sonho??? Poder algum dia retribuir pelo menos um pouco do que vocês fizeram e fazem até hoje por mim... Amo vocês!” ... Essas foram minhas palavras na dedicatória da minha dissertação de mestrado... E hoje, depois de 4 anos, escrevendo a dedicatória da tese de doutorado, vocês continuam sendo minha razão de estar aqui, me esforçando para fazer o meu melhor sempre, pois peço a Deus e ainda tenho fé que irei realizar meu sonho de poder dar **TUDO** o que vocês merecem em agradecimento a tudo que fizeram e ainda fazem por mim... Obrigada por me ensinarem cada dia a ser um ser humano melhor... Amo vocês!*

*Meu muito obrigado...*

*A Deus e Nossa Senhora Aparecida por sempre me proteger, guiar e iluminar meu caminho nesta caminhada, pois seu que de joelhos sou muito mais forte e posso ir além...*

*Aos meus pais, Sandra e Sidinei, que sempre acreditaram na minha capacidade e me incentivaram a estar aqui desde o princípio;*

*A Profa. Dra. Tais Maria Bauab, minha orientadora... Serei eternamente grata por acreditar em mim desde o dia em que fui me apresentar. Obrigada por ter me recebido em seu laboratório com tanto carinho e sempre disposta a nos ensinar com essa dedicação inigualável. Agradeço também por toda proteção que você sempre teve conosco, cuidando de todos os alunos com tanto amor e carinho como se fossem filhos. Obrigada pela oportunidade concedida que me levarei para o resto de minha vida;*

*A minha co-orientadora Profa. Dra. Janaína Sardi por todo carinho e aprendizado. Agradeço muito por ter feito parte deste trabalho e por ter confiado em mim e me indicado para realizar o sanduíche com o Dr. Lopez. Se não fosse você jamais iria ter tido essa oportunidade que foi tão importante em minha vida. Obrigada pelos conselhos e por estar sempre disposta a me ajudar;*

*Ao Prof. Dr. José Luis Lopez-Ribot por ter me aceitado em seu laboratório e com tanto amor, dedicação e paciência ter me proporcionado esse período que considero essencial em minha vida. Tão quanto o crescimento profissional, esta oportunidade me fez crescer pessoalmente e serei eternamente grata a cada gesto seu para que eu pudesse me sentir em casa mesmo estando tão longe da minha família e amigos. Obrigada por ser esse ser humano incrível que cativa a todos;*

*Ao Prof. André Gonzaga dos Santos pela grande parceria juntos. Você foi essencial para a realização deste trabalho. Agradeço pelo carinho e paciência que sempre teve para poder me ensinar assuntos que jamais havia aprendido na área. Obrigada por me aconselhar para que tudo pudesse sair da melhor forma possível e também pode ter me recebido tão bem em seu laboratório.*

*Ao Prof. Dr. Marlus Chorilli, pela colaboração nos ensaios nanotecnológicos, parceria, amizade, incentivos, oportunidades oferecidas;*

*Ao Prof. Dr. Wagner Vilegas e ao aluno Leonardo Perez de Souza por fornecer os extratos de *Astronium sp*, pela amizade e por estarem sempre dispostos a me ajudar com todas as informações necessárias para a realização deste trabalho;*

*À Profa. Dra. Cássia Regina Primila Cardoso da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT) pela atenção e disposição concedida em relação ao processo de documentação de registro genético dos extratos de *Astronium sp*;*

*Ao Prof. Dr. Jorge Tamashiro pela coleta e identificação de *Astronium urundeuva*;*

*Aos professores doutores Daniel Rinaldo (UNESP Bauru) e Flávia Rezende (Universidade de Araraquara – UNIARA) pela amizade e por terem feito parte da minha banca de exame de qualificação de doutorado, cujas contribuições foram essenciais para que este trabalho pudesse ser finalizado;*

*Aos professores doutores, Elfriede Marianne Bacchi (Universidade de São Paulo – USP), Margarete Gotardo de Almeida (Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP), Ana Helena Januário (Universidade de Franca – UNIFRAN) e Flávia Rezende (Universidade de Araraquara – UNIARA) por aceitarem participar da minha banca de defesa de doutorado... Tenho certeza que as contribuições serão extremamente valiosas;*

*Ao Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan e a pós doutoranda Isabel Silva pela parceria nos ensaios de citotoxicidade. Agradeço também pela amizade e também por estarem sempre disponíveis a contribuir com nossos projetos;*

*A Profa. Dra. Lourdes C. dos Santos do laboratório de Fitoquímica por sempre me receber com carinho em seu laboratório e permitir a realização de diversas análises que foram de extrema importância para este projeto;*

*A Coordenadora da Pós-graduação e amiga Profa. Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro pela amizade e incentivos;*

*A secretária do Departamento de Ciências Biológicas, Margarete Rossi pela disposição e atenção;*

*As técnicas do laboratório de Microbiologia Néia, Débora e Sílvia por todo apoio técnico e por sempre estarem dispostas a ajudar e dividir conosco seus anos de experiência no laboratório;*

*Aos meus amigos do laboratório de Fisiologia de Microrganismos meu agradecimento especial a Luciani Toledo, Felipe Hilário, Matheus Ramos e Anderson Noronha pelo companheirismo e amizade. Agradeço por fazerem meus dias mais felizes e por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos. Vocês são os melhores companheiros que qualquer pessoa poderia ter... Amo vocês! Agradeço também as alunas de Iniciação Científica, Laura Caminitti, Veridiana Gomes e Jéssica Degrandi por estarem sempre dispostas a nos ajudar e aprender...*

*Um agradecimento mais que especial à minha amiga Patrícia Bento, que tem todo o meu respeito, carinho e admiração. A considero muito mais que uma amiga que faz o impossível para me ver bem tanto profissionalmente quanto pessoalmente. Agradeço por toda ajuda proporcionada em todos os sentidos e por estar sempre ao meu lado pro que der e vier. Não conseguiria expressar com palavras o tamanho do meu carinho e gratidão, amiga!*

*Aos amigos do laboratório de Farmacognosia Flávio Carvalho, Luiza Mota, Fernando Oda, Célia Martin e Caio Perego por estarem sempre dispostos a me ajudar no que fosse preciso. Obrigada também pela amizade e pelos momentos divertidos que passamos juntos;*

*Aos amigos do laboratório Candida's lab da UTSA (Estados Unidos) Taissa Vila, Semanti Sarkar, Gina Wall, Daniel Montelongo e Jesus Romo que me acolheram da melhor forma possível e tornaram esse momento mais que especial em minha vida. Agradeço por todos os ensinamentos, paciência e dedicação e principalmente pela amizade;*

*A minha amiga Katia Wilson que foi a melhor professora de inglês que eu poderia ter em San Antonio, TX durante a realização do doutorado sanduíche;*

*A minha amiga Laryssa Dietrich que em tão pouco tempo se tornou mais que especial em minha vida sempre me motivando a ser uma pessoa melhor em todos os sentidos e que mesmo longe, está sempre disposta a me ajudar, aconselhar e incentivar;*

*Aos amigos do laboratório de Micobacteriologia: Isabel Silva, Débora Leite e Camila Maringolo pela amizade e companheirismo;*

*As amigas Célia Casado, Laize Juvenal e Gabi Romão, minhas companheiras de casa, agradeço simplesmente pelo nosso convívio, sempre me proporcionando dias de muita alegria e me aconselhando em tudo que precisei;*

*Ao amigo Henrique Mesquita que esteve disposto a me ajudar em tudo o que precisasse sempre com a maior boa vontade e educação que uma pessoa poderia ter;*

*As funcionárias da Seção de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Cláudia Molina, Daniela Tita, Aniele Vilella, Christiane Calife pela atenção, cordialidade e amizade;*

*A Irani e demais funcionárias da Biblioteca da FCFar, por toda prestatividade e correção das referências deste trabalho;*

*A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP):*  
*- bolsas de doutorado no país (Processo 2013/25121-5) e exterior BEPE (2015/19011-8);*  
*- aos projetos regulares processos número 2013/25432-0 e 2016/08559-5;*  
*- projetos temáticos Biota processos número 02/05503-6 e 2009/52237-9;*

*A The University of Texas at San Antonio (UTSA) pela realização do doutorado sanduíche;*

*A Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, Araraquara.*

## RESUMO

Apesar do grande avanço tecnológico direcionado à indústria farmacêutica, os micro-organismos continuam adquirindo cada vez mais resistência aos fármacos convencionalmente utilizados e, pesquisadores de diversas áreas buscam novas fontes antimicrobianas de origem natural, a exemplo das plantas medicinais. Dentre as infecções fúngicas, destacam-se aquelas causadas por leveduras do gênero *Candida* sp. a exemplo da candidíase vulvovaginal (CVV). A planta *Astronium urundeuva* (Allemão) Engl. apresenta uma série de propriedades biológicas, incluindo a atividade antifúngica. Este trabalho teve como objetivo aprofundar os estudos direcionados a atividade antifúngica dessa planta medicinal de modo a investigar as substâncias responsáveis por esta propriedade biológica através do fracionamento biomonitorado. Dentre os componentes majoritários identificados no extrato (ácido gálico, galato de metila e galato de etila), pode-se observar que as substâncias galato de etila e galato de metila são responsáveis por grande parte da atividade antifúngica contra a espécie *C. glabrata* enquanto que a atividade contra a espécie *C. albicans* parece estar relacionada a um efeito sinérgico dos componentes do extrato, incluindo os minoritários. Os resultados do ensaio *in vivo* confirmaram a atividade antifúngica exibida pelo extrato, mas, além disso, mostrou uma melhor atividade do extrato incorporado na microemulsão (ME), confirmando o efeito fungicida *in vitro* apresentado por este. Os ensaios de citotoxicidade (IC<sub>50</sub>), realizados frente às linhagens celulares VERO, MRC5 e HaCaT mostraram que o extrato não apresentase citotóxico quando comparado com o controle positivo utilizado (doxorrubicina). Além disso, após a incorporação do extrato em uma ME, o índice de seletividade (IS) aumentou significativamente principalmente quando analisado para a linhagem VERO. Quando testado contra os isolados clínicos de ambas as espécies de *Candida* sp., o extrato livre apresentou marcante atividade, mesmo contra aqueles considerados resistentes aos fármacos convencionalmente utilizados na terapia clínica (fluconazol, anfotericina B e caspofungina). Além do ensaio de susceptibilidade para células planctônicas, a amostra vegetal também foi avaliada quanto a sua atividade anti-biofilme e, embora não tenha apresentado atividade em biofilmes pré-formados nas concentrações testadas, o extrato livre foi capaz de inibir a formação de biofilme de *C. albicans* SC5314 na mesma concentração efetiva para células planctônicas (CIM<sub>90</sub> de 125-250 µg/mL). O estudo de combinação, avaliado pelo ensaio *checkerboard*, apresentou sinergismo quando o extrato livre foi combinado com fluconazol contra as duas espécies de *Candida* sp. Além disso, o efeito sinérgico também foi observado quando a anfotericina B foi combinada com o extrato livre (contra *C. albicans*) e o padrão de galato de etila (contra *C. glabrata*). Após o ensaio de passagem seriada, foi observado que as cepas desenvolveram resistência apenas ao fluconazol, mas não para o extrato livre. Além do gênero *Candida* sp., a amostra vegetal também foi testada contra o gênero *Cryptococcus* sp., destacando-se os resultados apresentados para a espécie *C. neoformans* WSA (CIM<sub>90</sub> 1,95 µg/mL) e, dentre alguns fungos filamentosos testados, a amostra vegetal mostrou-se efetiva apenas contra *Rhizopus arrhizus*. Os resultados mostraram que o extrato das folhas de *A. urundeuva* apresenta atividade antifúngica promissora contra as espécies de *Candida*, principalmente contra a espécie de *C. glabrata*.

**Palavras-chave:** *Astronium urundeuva* (Allemão) Engl. Fitoquímica. Atividade antifúngica. *Candida* sp. Candidíase vulvovaginal. Biofilme. *Checkerboard*. Experimento de passagem seriada. *Artemia salina* L.

**ABSTRACT**

Despite the great technological advances directed to the pharmaceutical industry, microorganisms continue to acquire more and more resistance to the drugs conventionally used in the therapy, and researchers from several areas keep searching new natural antimicrobial sources, such as medicinal plants. Among fungal infections, we highlight those caused by yeasts from the genus *Candida* sp., for example vulvovaginal candidiasis (VVC). *Astronium urundeuva* (Allemao) Engl. plant has various biological properties, including antifungal activity. This work aimed to improve the researches directed to the antifungal activity of this medicinal plant in order to investigate the substances responsible for this biological property using bioassay-guided fractionation technique. Among the major components identified in the extract (gallic acid, methyl gallate and ethyl gallate), we could observe that the substances ethyl gallate and methyl gallate are responsible a large part of the antifungal activity against *C. glabrata* species whereas the activity against *C. albicans* species seems to be related to a synergistic effect of the components of the extract, including the minority ones. The *in vivo* results confirmed the antifungal activity exhibited by the extract, but, in addition, showed a better activity of the extract loaded into a microemulsion (ME), confirming the *in vitro* fungicidal effect presented by it. The cytotoxicity assays (IC<sub>50</sub>) performed for VERO, MRC5 and HaCaT cell lines showed that the extract were not cytotoxic when compared to the positive control (doxorubicin). In addition, after loaded into the ME, the selectivity index (SI) significantly increased, especially when analyzed for the VERO cell line. When tested against clinical isolates of both species of *Candida* sp., the free extract showed really effective activity, even against those considered resistant to the drugs conventionally used in clinical therapy (fluconazole, amphotericin B and caspofungin). In addition to the susceptibility test for planktonic cells, the plant sample was also evaluated for its anti-biofilm activity and, although it did not show activity in preformed biofilms at the concentrations that were tested, the free extract was able to inhibit the biofilm formation of *C. albicans* SC5314 at the same effective concentration for planktonic cells (MIC<sub>90</sub> of 125-250 µg/mL). The combination study, evaluated by the checkerboard assay, showed synergism when the free extract was combined with fluconazole against both species of *Candida* sp. In addition, the synergistic effect was also observed when amphotericin B was combined with the free extract (against *C. albicans*) and the ethyl gallate (against *C. glabrata*). After the serial passage assay, it was observed that the strains developed resistance only to fluconazole, but not to the free extract. In addition to the genus *Candida* sp., the plant sample was also tested against the genus *Cryptococcus* sp., highlighting the results presented for *C. neoformans* WSA (MIC<sub>90</sub> of 1.95 µg/mL) and, among some filamentous fungi that were tested, the plant sample was only effective against *Rhizopus arrhizus*. The results showed that *A. urundeuva* leaves extract presents promising antifungal activity against *Candida* species, especially for *C. glabrata*.

**Keywords:** *Astronium urundeuva* (Allemao) Engl. Phytochemistry. Antifungal activity. *Candida* sp. Vulvovaginal candidiasis. Biofilm. Checkerboard. Serial passage assay. *Artemia salina* L.

LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Microscopia eletrônica de varredura de *C. albicans* na forma de levedura, hifas e/ou pseudohifas. .... 25

**Figura 2.** Mecanismos de ação dos diferentes agentes antifúngicos disponíveis na terapia clínica. .... 27

**Figura 3.** Processo de formação de um biofilme microbiano através aderência (etapas 1 e 2), expansão e maturação (etapas 3 e 4) e dispersão (5). .... 29

**Figura 4.** Matriz exopolimérica envolvendo a levedura *C. albicans*. .... 29

**Figura 5.** Planta *A. urundeuva* (Allemão) Engl. .... 33

**Figura 6.** Gotículas formadas em uma microemulsão água óleo (A/O) e óleo água (O/A) devido a presença de surfactante e co-surfactante, os quais estão posicionados de acordo sua afinidade com a fase interna/externa. .... 35

**Figura 7.** Etapas utilizadas no fracionamento do extrato hidroetanólico das folhas de *A. urundeuva* por partição líquido líquido (A) e extração em fase sólida (B) com posterior análise por cromatografia em camada delgada. .... 41

**Figura 8.** Esquema do ensaio anti-candidíase vulvovaginal. .... 52

**Figura 9.** Design da microplaca para o ensaio de microdiluição frente às células planctônicas de *C. albicans* e *C. glabrata*. .... 53

**Figura 10.** Ensaio *checkerboard* para amostras em combinação frente a *C. albicans* e *C. glabrata*. .... 55

**Figura 11.** Fluxograma de fracionamento do extrato hidroetanólico das folhas de *A. urundeuva*. .... 58

**Figura 12.** Cromatoplasmas do extrato (Ext), fase aquosa (FA) e fase orgânica (FO) na menor e maior escala, respectivamente. .... 59

**Figura 13.** Cromatoplasmas do extrato, FO, FA e frações obtidas da EFS 1, após revelação com anisaldeído sulfúrico 10 % e cloreto férrico 1%, respectivamente. .... 60

**Figura 14.** Cromatoplasmas do extrato, FO, FA e frações obtidas da EFS 2, após revelação com anisaldeído sulfúrico 10% e cloreto férrico 1%, respectivamente. .... 61

**Figura 15.** Cromatoplasmas do extrato, FO, FA e frações obtidas da EFS 3, após revelação com anisaldeído sulfúrico 10% e cloreto férrico 1%, respectivamente. .... 62

**Figura 16.** Cromatoplasma do extrato, FO, FA, frações obtidas da EFS 3 e padrão de ácido gálico após revelação com cloreto férrico 1%. .... 63

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 17.</b> Espectros na região do UV do extrato bruto, FA, fração 1 e padrão de ácido gálico.<br>.....   | 64 |
| <b>Figura 18.</b> Espectro na região do UV da fração 2. ....  | 64 |
| <b>Figura 19.</b> Espectros na região do UV das frações 4, 5 e 6. ....  | 65 |
| <b>Figura 20.</b> Espectro na região do UV da fração 3. ....  | 65 |
| <b>Figura 21.</b> Espectro na região do UV da FO. ....  | 65 |
| <b>Figura 22.</b> Espectro na região do UV da fração 7. ....  | 66 |
| <b>Figura 23.</b> Microplaca após revelação com TTC (2%), na qual os poços incolores apresentam ausência de crescimento fúngico e os de coloração vermelha, presença de crescimento fúngico. ....   | 68 |
| <b>Figura 24.</b> Cromatograma representando o perfil do extrato e da fração 1 [Coluna Analítica Phenomenex® Luna C <sub>18</sub> , 250 x 4,60 mm de diâmetro interno; Solvente A: H <sub>2</sub> O + 0,01% TFA; Solvente B: metanol + 0,01% TFA. Gradiente de 5-50% de B por 30 min, de 50-100% de B por 5 min e 100% de B por 10 min; vazão de 1 mL/min; λ= 272 nm]. ....             | 69 |
| <b>Figura 25.</b> Espectros na região do UV dos picos 1-4 do extrato e da fração 1; λ = 272 nm. ..  | 70 |
| <b>Figura 26.</b> Cromatograma da fração 1 obtida em CLAE-UV no modo preparativo [Coluna Zorbax® Eclipse XDB C <sub>18</sub> , 250 x 21,20 mm, 7 μm; Gradiente de 15-60% de metanol:água por 60 min; vazão de 8 mL/min; λ= 272 nm]. ....  | 71 |
| <b>Figura 27.</b> Espectro de massa (micrOTOFTM- Q II) da subfração 7. ....   | 73 |
| <b>Figura 28.</b> Estrutura química do galato de etila. ....  | 74 |
| <b>Figura 29.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (300 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da subfração 7. ....   | 75 |
| <b>Figura 30.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C (300 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da subfração 7. ....  | 76 |
| <b>Figura 31.</b> Estrutura química do 1,2,3,4,6-penta-O-galoil-β-D-glicose (PGG). ....   | 77 |
| <b>Figura 32.</b> Cromatograma do extrato ( <i>clean up</i> com MeOH) obtido em CLAE-DAD no modo analítico [Coluna Phenomenex® Synergi Hydro C <sub>18</sub> , 250 x 4,6 mm, 4 μm; Solvente A: H <sub>2</sub> O + 0,01% TFA; Solvente B: metanol + 0,01% TFA. Gradiente de 5-50% de B por 30 min, de 50-100% de B por 5 min e 100% de B por 10 min; vazão de 1 mL/min; λ= 280 nm]. .... | 78 |
| <b>Figura 33.</b> Cromatograma do extrato obtido em CLAE-DAD no modo analítico [Coluna Phenomenex® Synergi Hydro C <sub>18</sub> , 250 x 4,6 mm, 4 μm; Gradiente de 0-15% de ACN (15 min), 15-20% ACN (30 min), 20-30% ACN 30-100% (5 min), 100% ACN (5 min); vazão de 1 mL/min; λ= 280 nm]. ....   | 79 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figura 34.</b> Cromatograma do extrato obtido em CLAE-DAD no modo analítico [Coluna Phenomenex® Synergi Hydro C <sub>18</sub> , 250 x 4,6 mm, 4 µm; Gradiente de 0-15% de ACN (15 min), 15-20% ACN (30 min), 20-30% ACN (30 min), 30-100% (5 min), 100% ACN (5 min); vazão de 1 mL/min; λ= 280 nm].   | 80  |
| <b>Figura 35.</b> Cromatograma do extrato + padrão de ácido gálico em CLAE-UV no modo analítico [Coluna Hypersil Gold® C <sub>18</sub> , 250 x 4,6 mm, 5 µm; Solvente A: H <sub>2</sub> O; Solvente B: ACN. Gradiente de 15-60% de B por 60 min; vazão de 0,4 mL/min; λ= 280 nm].  | 80  |
| <b>Figura 36.</b> Cromatograma do extrato + padrão de galato de metila obtido em CLAE-DAD no modo analítico [Coluna Phenomenex® Synergi Hydro C <sub>18</sub> , 250 x 4,6 mm, 4 µm; Solvente A: H <sub>2</sub> O + 0,01% TFA; Solvente B: metanol + 0,01% TFA. Gradiente de 5-50 % de B por 30 min, de 50-100% de B por 5 min e 100% de B por 10 min; vazão de 1 mL/min; λ= 280 nm]. | 81  |
| <b>Figura 37.</b> Estrutura química do ácido gálico.   | 81  |
| <b>Figura 38.</b> Estrutura química do galato de metila.   | 81  |
| <b>Figura 39.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (300 MHz, CD <sub>3</sub> OD) do galato de metila.  | 82  |
| <b>Figura 40.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C (300 MHz, CD <sub>3</sub> OD) do galato de metila.   | 83  |
| <b>Figura 41.</b> Cromatograma do extrato + padrão de galato de etila obtido em CLAE-DAD no modo analítico [Coluna Phenomenex® Synergi Hydro C <sub>18</sub> , 250 x 4,6 mm, 4 µm; Solvente A: H <sub>2</sub> O + 0,01% TFA; Solvente B: metanol + 0,01% TFA. Gradiente de 5-50% de B por 30 min, de 50-100% de B por 5 min e 100% de B por 10 min; vazão de 1 mL/min; λ= 280 nm].   | 83  |
| <b>Figura 42.</b> Curvas analíticas para as soluções padrão de ácido gálico, galato de metila e galato de etila utilizadas na quantificação de substâncias do extrato das folhas de <i>A. urundeuva</i> .  | 86  |
| <b>Figura 43.</b> Porcentagem de viabilidade de <i>Artemia salina</i> L. em relação a concentração das amostras utilizadas.  | 95  |
| <b>Figura 44.</b> Análise microscópica de <i>C. albicans</i> não tratada (A e C) ou tratada (B e D) com o extrato livre na concentração de CIM <sub>90</sub> (250 µg/mL) após 24 horas em aumento de 10 (A/B) e 40 (C/D) x, respectivamente.   | 100 |
| <b>Figura 45.</b> Análise microscópica de <i>C. albicans</i> não tratada (A e C) ou tratada (B e D) com o extrato livre na concentração de CIM <sub>90</sub> (250 µg/mL) após 48 horas em aumento de 10 (A/B) e 40 (C/D) x, respectivamente.   | 100 |

**Figura 46.** Análise microscópica de *C. glabrata* não tratada (A e C) ou tratada (B e D) com o extrato livre na concentração de CIM<sub>90</sub> (31.25 µg/mL) após 24 horas em aumento de 10 (A/B) e 40 (C/D) x, respectivamente. .... 101

**Figura 47.** Análise microscópica de *C. glabrata* não tratada (A e C) ou tratada (B e D) com o extrato livre na concentração de CIM<sub>90</sub> (31.25 µg/mL) após 48 horas em aumento de 10 (A/B) e 40 (C/D) x, respectivamente. .... 101

**Figura 48.** Ensaio anti-biofilme revelado com XTT para a levedura *C. albicans* SC5314, onde os poços que permaneceram incolores apresentam ausência de viabilidade celular e, os que alteraram sua coloração para o laranja, presença de viabilidade celular. .... 106

**Figura 49.** Mapa de cores do galato de etila em combinação com anfotericina B em *Candida glabrata* ATCC 2001..... 108

**Figura 50.** Mapa de cores do extrato livre em combinação com a anfotericina B em *Candida albicans* SC5314..... 109

**Figura 51.** Mapa de cores do extrato livre em combinação com fluconazole em *Candida albicans* SC5314..... 109

**Figura 52.** Mapa de cores do extrato livre em combinação com fluconazol em *Candida glabrata* ATCC 2001..... 109

**LISTA DE TABELAS**

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1.</b> Condições utilizadas durante a partição líquido-líquido (PLL) e a extração em fase sólida (EFS) em diferentes escalas. ....  | 40 |
| <b>Tabela 2.</b> Gradientes utilizados durante as extrações em fase sólida (EFS) para a obtenção das frações.....   | 42 |
| <b>Tabela 3.</b> Fases móveis testadas para cromatografia em camada delgada (CCD).....  | 43 |
| <b>Tabela 4.</b> Relação de cepas clínicas de <i>Candida</i> sp. com perfil de susceptibilidade e padrões clínicos.....   | 46 |
| <b>Tabela 5.</b> Grupos de experimentação para o ensaio anti-candidíase vulvovaginal (CVV). ....  | 51 |
| <b>Tabela 6.</b> Valores de CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) das amostras vegetais através da revelação com TTC (2%). ....  | 67 |
| <b>Tabela 7.</b> Massa e rendimento das subfrações obtidas da fração 1. ....  | 71 |
| <b>Tabela 8.</b> Valores de CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) das subfrações através da revelação com TTC (2%).....  | 72 |
| <b>Tabela 9.</b> Dados espectrométricos de RMN obtidos para a subfração 7 a 300 MHz para $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ .....   | 74 |
| <b>Tabela 10.</b> Valores de RMN de $^1\text{H}$ da substância X ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ), de acordo com Carvalho (2013). ....  | 77 |
| <b>Tabela 11.</b> Dados espectrométricos de RMN obtidos para o galato de metila a 300 MHz para $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ .....   | 82 |
| <b>Tabela 12.</b> Valores de CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) do extrato e substâncias identificadas através da revelação com TTC (2%). ....  | 84 |
| <b>Tabela 13.</b> Dados obtidos na quantificação de ácido gálico no extrato hidroetanólico das folhas de <i>A. urundeuva</i> . ....   | 86 |
| <b>Tabela 14.</b> Dados obtidos na quantificação de galato de metila no extrato hidroetanólico das folhas de <i>A. urundeuva</i> . ....   | 87 |
| <b>Tabela 15.</b> Dados obtidos na quantificação de galato de etila no extrato hidroetanólico das folhas de <i>A. urundeuva</i> . ....  | 87 |
| <b>Tabela 16.</b> Teor das substâncias identificadas no extrato hidroetanólico das folhas de <i>A. urundeuva</i> . ....   | 87 |
| <b>Tabela 17.</b> Efeito inibitório do ácido gálico, galato de metila e galato de etila combinados entre si em <i>Candida albicans</i> SC5314 e <i>Candida glabrata</i> ATCC 2001. .... | 88 |

**Tabela 18.** Valores de CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) do extrato, subfração 7 e substâncias isoladas através da revelação com TTC (2%). ..... 90

**Tabela 19.** Valores das médias e desvio-padrão dos tamanhos das partículas e IPD para as MEs base A e B e para os extratos incorporados na microemulsão (ME) após o preparo. .... 92

**Tabela 20.** Resultados da CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) frente às cepas de *Candida* sp, do  $\text{IC}_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) sobre as linhagens celulares VERO e MRC-5 e o valor do IS da razão entre esses dois resultados do extrato hidroetanólico das folhas de *A. urundeuva* livre ou na microemulsão (ME). ..... 93

**Tabela 21.** Quantificação da carga fúngica obtida nos grupos. .... 96

**Tabela 22.** Efeito inibitório ( $\mu\text{g/mL}$ ) do galato de etila, extrato livre e incorporado, e o fármaco convencional fluconazol contras os isolados clínicos de *Candida albicans*. ..... 98

**Tabela 23.** Efeito inibitório ( $\mu\text{g/mL}$ ) do galato de etila, extrato livre e incorporado, e padrão antifúngico fluconazol em isolados clínicos TW e mutantes de cepas ganhadoras de função de *C. albicans*. ..... 102

**Tabela 24.** Efeito inibitório ( $\mu\text{g/mL}$ ) do galato de etila, extrato livre e incorporado e padrões antifúngicos fluconazol e equinocandina contra isolados clínicos de *C. glabrata*. ..... 104

**Tabela 25.** Efeito ( $\mu\text{g/mL}$ ) do galato de etila, extrato livre e incorporado na inibição da formação e em biofilmes pré-formados de *C. albicans* and *C. glabrata*. ..... 106

**Tabela 26.** Efeito inibitório do galato de etila, extrato livre e incorporado em combinação com a anfotericina B, fluconazol e equinocandina em *C. albicans* SC5314. Números dados em parênteses indicam ICIF para combinações que representam sinergismo. .... 108

**Tabela 27.** Efeito inibitório do galato de etila, extrato livre e incorporado em combinação com a anfotericina B, fluconazol e equinocandina em *C. glabrata* ATCC 2001. Números dados em parênteses indicam ICIF para combinações que representam sinergismo. .... 108

**Tabela 28.** Concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ ) estabelecidas para o extrato livre e fluconazol frente às cepas de *C. albicans* SC5314 e *C. glabrata* ATCC 2001 utilizadas no ensaio de desenvolvimento da resistência. .... 110

**Tabela 29.** Efeito inibitório ( $\mu\text{g/mL}$ ) do galato de etila, extrato livre e incorporado contra *Cryptococcus neoformans* (H99, WSA and R4247) e *Cryptococcus gattii* (R265). ..... 111

**Tabela 30.** Concentração do extrato livre ( $\mu\text{g/mL}$ ) contra múltiplas espécies fúngicas para inibir 50% e 100% viabilidade celular. .... 112

LISTA DE ABREVIATURAS

|                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| ACN                               | Acetonitrila   |
| ANVISA                            | Agência Nacional de Vigilância Sanitária                         |
| ATCC                              | <i>American Type Culture Colection</i>                           |
| ASD                               | Ágar sabouraud dextrose  |
| CAV3                              | Cepa clínica de <i>C. albicans</i>                               |
| CCD                               | Cromatografia em camada delgada                                  |
| CD <sub>3</sub> COCD <sub>3</sub> | Acetona deuterada  |
| CFM                               | Concentração fungicida mínima                                    |
| CD <sub>3</sub> OD                | Metanol deuterado  |
| CGV3                              | Cepa clínica de <i>C. glabrata</i>                               |
| CIF                               | Concentração inibitória fracionada                               |
| CIM                               | Concentração inibitória mínima (Sigla em inglês: MIC)            |
| CL <sub>50</sub>                  | Concentração letal mediana (Sigla em inglês: LD <sub>50</sub> )  |
| CLAE                              | Cromatografia líquida de alta eficiência (Sigla em inglês: HPLC) |
| CLSI                              | <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>               |
| CPA                               | <i>Ciclophosphamide</i> (ciclofosfamida)                         |
| CSD                               | Caldo sabouraud dextrose   |
| CVV                               | Candidíase vulvovaginal  |
| DAD                               | Detector de Arranjo de Diodos                                    |
| DMSO                              | Dimetilsulfóxido   |
| DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>       | Dimetilsulfóxido deuterado                                       |
| DMEM                              | <i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>                        |
| DST                               | Doença sexualmente transmissível                                 |
| EFS                               | Extração em fase sólida  |
| EM                                | Espectroscopia de Massa (Sigla em inglês: MS)                    |
| FA                                | Fase aquosa  |
| FDA                               | <i>Food and Drug Administration</i>                              |
| FE                                | Fase estacionária  |
| FM                                | Fase móvel   |
| FO                                | Fase orgânica  |

|                  |   |
|------------------|---|
| FOI              | Fase oleosa   |
| HIV              | <i>Human Immunodeficiency Virus</i>                                   |
| HPLC             | <i>High performance liquid chromatography</i>                         |
| IC <sub>50</sub> | Índice de Citotoxicidade  |
| ICIF             | Índice da concentração inibitória fracionada (Sigla em inglês: FICI)  |
| IPD              | Índice de Polidispersidade  |
| IS               | Índice de Seletividade  |
| LD <sub>50</sub> | <i>Lethal Dose</i>  |
| ME               | Microemulsão  |
| MeOH             | Metanol   |
| MIC              | <i>Minimum Inhibitory Concentration</i>                               |
| MOPS             | Ácido 3-[N-morfino] propanossulfônico                                 |
| MS               | <i>Mass spectroscopy</i>  |
| PBS              | <i>Phosphate buffered saline</i> (tampão fosfato)                     |
| PGG              | 1,2,3,4,6-penta-O-galoil- $\beta$ -D-glicose                          |
| PLL              | Partição Líquido-Líquido  |
| $R_f$            | Fator de retenção   |
| RMN              | Ressonância Magnética Nuclear   |
| RP               | <i>Reverse-phase</i> (fase reversa)                                   |
| rpm              | Rotações por minuto   |
| RPMI             | <i>Roswell Park Memorial Institute</i>                                |
| T                | Tensoativo  |
| TFA              | Ácido trifluoroacético ( <i>Trifluoroacetic acid</i> )                |
| TMS              | Tetrametilsilano  |
| $t_R$            | Tempo de retenção   |
| TTC              | Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio                                   |
| UFC              | Unidade Formadora de Colônia  |
| UTI              | Unidades de Terapia Intensiva   |
| UV               | Ultravioleta  |
| v                | volume  |
| XTT              | 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida |
| YPD              | <i>Yeast extract peptone dextrose</i>                                 |

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....  | <b>20</b> |
| <b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....   | <b>22</b> |
| 2.1. Infecções fúngicas e o gênero <i>Candida</i> sp.....   | 22        |
| 2.2. A candidíase vulvovaginal (CVV).....   | 24        |
| 2.3. <i>Candida albicans</i> .....  | 24        |
| 2.4. <i>Candida glabrata</i> .....  | 26        |
| 2.5. Tratamento da CVV e resistência aos antifúngicos convencionais .....   | 26        |
| 2.6. Biofilmes.....   | 28        |
| 2.7. Plantas medicinais como novas fontes antimicrobianas .....   | 30        |
| <b>2.7.1. Astronium urundeuva</b> .....   | <b>32</b> |
| 2.8. Sistemas nanoestruturados .....  | 34        |
| <b>3. OBJETIVOS</b> .....   | <b>37</b> |
| 3.1. Objetivo geral .....   | 37        |
| 3.2. Objetivos específicos .....  | 37        |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....  | <b>38</b> |
| 4.1. Obtenção e procedência do extrato vegetal .....  | 38        |
| 4.2. Fracionamento do extrato vegetal.....  | 39        |
| 4.2.1. Partição Líquido-Líquido (PLL) .....   | 40        |
| 4.2.2. Extração em Fase Sólida (EFS) .....  | 41        |
| 4.2.3. Análise por cromatografia em camada delgada (CCD) do extrato vegetal,<br>fases obtidas da PLL e frações obtidas por EFS..... | 42        |
| 4.2.4. Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta (UV).....   | 43        |
| 4.2.5. Análise por CLAE-DAD do extrato vegetal e fração mais ativa no modo<br>analítico .....                                       | 43        |
| 4.2.6. Isolamento de substâncias a partir da fração mais ativa com o emprego de<br>CLAE preparativo de fase reversa.....            | 44        |
| 4.2.7. Determinação estrutural das substâncias da subfração mais ativa .....  | 44        |
| 4.2.8. Quantificação das substâncias identificadas no extrato das folhas de <i>A.</i><br><i>urundeuva</i> .....                     | 45        |

|  |           |
|--|-----------|
| 4.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente às cepas de <i>C. albicans</i> e <i>C. glabrata</i> .....   | 45        |
| 4.4. Incorporação das amostras vegetais no sistema nanosestruturado .....  | 46        |
| 4.4.1. Caracterização estrutural das microemulsões.....  | 47        |
| 4.5. Ensaio de toxicidade.....   | 48        |
| 4.5.1. Determinação da citotoxicidade em linhagens celulares .....   | 48        |
| 4.5.2. Avaliação da toxicidade aguda frente à <i>Artemia salina</i> L. (Artemiidae).49   |           |
| 4.6. Ensaio <i>in vivo</i> .....   | 50        |
| Experimentos realizados durante o Doutorado Sanduíche na .....   | 52        |
| The University of Texas at San Antonio (UTSA), Texas, Estados Unidos.....  | 52        |
| 4.7. Eficácia contra coleção de cepas e isolados clínicos de <i>Candida albicans</i> e <i>Candida glabrata</i> .....   | 52        |
| 4.8. Atividade contra biofilmes.....   | 53        |
| 4.9. Estudos de combinação com os fármacos antifúngicos convencionalmente utilizados .....   | 54        |
| 4.10. Experimento de passagem seriada para avaliar o potencial para o desenvolvimento de resistência .....   | 56        |
| 4.11. Eficácia contra cepas de <i>Cryptococcus neoformans</i> e <i>Cryptococcus gattii</i> .....   | 56        |
| 4.12. Espectro de ação contra múltiplas espécies fúngicas .....  | 56        |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>   | <b>58</b> |
| 5.1. Análise por CCD após PLL .....  | 58        |
| 5.2. Análise por CCD após Extração em Fase Sólida.....   | 59        |
| 5.3. Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta .....  | 63        |
| 5.4. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato, fases e frações frente cepas padrão e isolados clínicos de <i>C. albicans</i> e <i>C. glabrata</i> ..... | 66        |
| 5.5. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – DAD do extrato e da fração 1...68  |           |
| 5.6. Isolamento de substâncias a partir da fração 1 com o emprego de CLAE preparativo de fase reversa .....  | 71        |
| 5.7. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das subfrações da fração 1 .....   | 72        |
| 5.8. Determinação estrutural da subfração 7.....   | 73        |
| 5.8.1. Espectrometria de massa da subfração 7.....   | 73        |

|   |            |
|---|------------|
| 5.8.2. Ressonância Magnética Nuclear de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da subfração 7.....                            | 74         |
| 5.9. Identificação das demais substâncias majoritárias do extrato .....   | 76         |
| 5.10. Quantificação das substâncias identificadas no extrato das folhas de <i>A. urundeuva</i> .....                  | 85         |
| 5.11. Estudos de combinação entre as substâncias identificadas .....  | 88         |
| 5.12. Incorporação no sistema nanoestruturado .....   | 89         |
| 5.13. Concentração fungicida mínima (CFM) .....   | 91         |
| 5.14. Caracterização estrutural das microemulsões .....   | 92         |
| 5.15. Ensaio de Toxicidade .....  | 93         |
| 5.15.1. Determinação da citotoxicidade em linhagens celulares .....   | 93         |
| 5.15.2. Avaliação da toxicidade aguda frente à <i>Artemia salina</i> L. (Artemiidae)... ..                            | 94         |
| 5.16. Ensaio <i>in vivo</i> .....   | 96         |
| 5.17. Amostras utilizadas .....   | 97         |
| 5.18. Eficácia frente coleção de cepas e isolados clínicos de <i>Candida albicans</i> e <i>Candida glabrata</i> ..... | 98         |
| 5.19. Atividade contra biofilmes .....  | 105        |
| 5.20. Estudos de combinação da amostra vegetal com os antifúngicos convencionais .....                                | 107        |
| 5.21. Análise do potencial do desenvolvimento de resistência .....  | 110        |
| 5.22. Eficácia contra cepas de <i>Cryptococcus</i> sp.....  | 111        |
| 5.23. Espectro de ação contra múltiplas espécies fúngicas .....   | 112        |
| <b>6. CONCLUSÕES .....</b>  | <b>115</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>  | <b>118</b> |

### 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Candida* sp. compreende cerca de 150 espécies que podem habitar diversos ambientes corporais, como por exemplo, cavidade bucal, orofaringe, secreções brônquicas, dobras da pele, fezes, urina e vagina. O processo de colonização por leveduras deste gênero nas mucosas de todos os seres humanos ocorre durante ou logo após o nascimento e, são capazes de se adaptar rapidamente ao corpo humano e colonizá-lo sem causar candidíase, assim conhecida a doença causada por leveduras deste gênero. A doença somente irá desenvolver quando houver um desequilíbrio na relação homem *versus* micro-organismo, fazendo com que sejam classificadas como leveduras oportunistas (ACHKAR; FRIES, 2010; ÁLVARES et al., 2007).

A doença pode ser classificada em candidíase cutânea, mucosa, cutaneomucosa ou visceral de acordo com o local atingido, sendo a cavidade oral e a vagina, os locais considerados como de maior frequência devido sua temperatura e umidade favoráveis (BARBEDO; SGARBI, 2010). Dentro da candidíase cutaneomucosa, existem as geniturinárias ou não geniturinárias e, dentro das geniturinárias, a candidíase vulvovaginal (CVV) é considerada a mais comum ao atingir aproximadamente 75% das mulheres pelo menos uma vez durante a vida (MARRAZO, 2003) e, nos casos de maior frequência (pelo menos 4 vezes durante o período de 1 ano), a CVV pode ser classificada como recorrente. A CVV pode ser definida como a presença de sinais e sintomas inflamatórios que acometem vagina e vulva, causados pela presença evidenciada desse micro-organismo (ACHKAR; FRIES, 2010).

Apesar dos avanços científicos direcionados à terapia medicamentosa, cresce desenfreadamente o número de cepas que apresentam sensibilidade reduzida aos agentes antifúngicos já disponíveis no mercado, gerando como consequência um aumento no custo e mortalidade nas unidades de terapia intensiva (UTI) que apresentam pacientes infectados com cepas resistentes (BARAI et al., 2010). Nos Estados Unidos da América, o diagnóstico e tratamento da CVV geram custos anuais de um bilhão de dólares (BARBOSA et al., 2012).

Diante do surgimento de cepas cada vez mais resistentes juntamente com a importância da CVV se faz necessária a busca por substâncias que apresentem eficácia contra as cepas com sensibilidade reduzida. As fontes naturais, como por exemplo, as plantas medicinais, são popularmente utilizadas na terapia de diversas doenças. Aliado ao uso popular, os estudos voltados para as plantas com propriedades medicinais permitiu a descoberta de inúmeras substâncias de origem vegetal que apresentem alguma propriedade

terapêutica (COSTA et al., 2010; BRESOLIN; FILHO, 2010). As propriedades fitoquímicas e biológicas das plantas medicinais estimularam uma maior investigação sobre os compostos biologicamente ativos. Sabe-se que muitos metabólitos secundários presentes em extratos vegetais desempenham várias funções biológicas, entre elas a antimicrobiana.

De maneira a aprofundar a pesquisa com plantas medicinais e contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos, um grupo composto por vários pesquisadores de diversos laboratórios propuseram o projeto “Fitoterápicos padronizados para o tratamento de doenças crônicas” (Biota/FAPESP). Este projeto encontra-se em consonância com a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos do Ministério da Saúde e, dentre as plantas estudadas, encontra-se o *Astronium urundeuva* (Anacardiaceae), que apresenta diversas propriedades terapêuticas.

Um estudo realizado em nosso grupo de pesquisa (Laboratório de Fisiologia dos Microrganismos – UNESP Araraquara) avaliou a atividade antimicrobiana de extratos vegetais de caule e folhas de três espécies de *Astronium* sp. (*A. fraxinifolium*, *A. graveolens* e *A. urundeuva*) livres (solubilizadas em DMSO 10%) ou incorporados em uma microemulsão frente aos micro-organismos: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella setubal* (ATCC 19196), *Helicobacter pylori* (ATCC 43504) e *Candida albicans* (ATCC 18804). Dentre os resultados apresentados pelas espécies vegetais, destacaram-se aquelas apresentadas pela espécie das folhas de *A. urundeuva* frente a *C. albicans*, na qual sua atividade antifúngica foi ainda mais potencializada após incorporação na microemulsão desenvolvida (CIM<sub>90</sub> de 125 para 15,62 µg/mL). Além disso, foi realizado o ensaio *in vivo* a fim de avaliar o potencial anti-candidíase vulvovaginal do extrato mais promissor (folhas de *A. urundeuva*), no qual os resultados obtidos confirmaram os resultados *in vitro*, uma vez que o número de UFC/mL apresentado pelo grupo de animais tratado com o extrato incorporado foi reduzido em menor tempo em relação grupo tratado com o extrato livre (BONIFÁCIO et al., 2015). Estimulados por esses resultados, esse trabalho se propôs a aprofundar os estudos direcionados a atividade antifúngica desta espécie vegetal de maneira a identificar os constituintes majoritários do extrato ou até mesmo isolar as substâncias responsáveis pela atividade antifúngica, enriquecendo o arsenal terapêutico de agentes com propriedades antifúngicas. Além disso, não são relatadas na literatura artigos que tratam da identificação de substâncias das folhas de *A. urundeuva* que são responsáveis por esta propriedade anti-*Candida* sp, o que permitirá ineditismo de nossos resultados.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1. Infecções fúngicas**

Diante do elevado número de doenças que acometem o ser humano, principalmente aquelas capazes de debilitar o sistema imune do hospedeiro, maior atenção têm sido dada as doenças causadas por fungos, uma vez que a redução de linfócitos CD4<sup>+</sup> predispõe o paciente a diversas infecções fúngicas. Um exemplo bastante comum são os pacientes infectados com o *Human Immunodeficiency Virus* (HIV), os quais apresentam quadros frequentes de infecções fúngicas (BROWN et al., 2012; ARMSTRONG-JAMES et al., 2014; NETEA et al., 2015).

Ao atingir uma população crescente de pacientes imunocomprometidos, as doenças causadas por fungos estão sendo consideradas uma ameaça global. As infecções fúngicas oportunistas são relatadas desde o início de 1980, quando foram reportados os primeiros casos de *Acquired Immune Deficiency Syndrome* (AIDS) em São Francisco e em Nova York. Dentre os 400 casos reportados de mortes causadas por infecções fúngicas em pacientes com HIV/AIDS, 70% dessas foram inicialmente causadas por *Pneumocystis pneumonia*. Recentemente, os quadros de meningite causada por criptococose são responsáveis pela maioria das mortes relacionadas a infecções fúngicas em pacientes com HIV (ARMSTRONG-JAMES et al., 2014).

Além das doenças causadoras de imunossupressão, existem diversos outros fatores que podem contribuir para o surgimento das infecções fúngicas, como por exemplo, o uso de imunossupressores utilizados no tratamento de outros tipos de doenças. Quadros de neutropenia onde o número de neutrófilos/mL é inferior a 500 por um período superior a 10 dias, malignidades hematológicas, transplantes, permanência prolongada em unidades de terapia intensiva (UTI), tratamento com quimioterápicos e outros procedimentos médicos invasivos também são alguns fatores capazes de facilitar o surgimento de tais infecções (BADIEE; HASHEMIZADEH, 2014). OBS

Dentre as diversas infecções fúngicas, destacam-se aquelas causadas por leveduras do gênero *Candida* sp. Cerca de 150 espécies deste gênero normalmente habitam os mais diversos ambientes corporais, como a cavidade bucal, orofaringe, secreções brônquicas, dobras da pele, fezes, urina e vagina. Dentre todas as espécies, pelo menos quinze são capazes de desenvolver a candidíase, assim conhecida à doença causada por leveduras deste gênero. Contudo, mais de 90% de todos os casos da doença envolvem cinco espécies principais: *C.*

*albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei* (ARAÚJO; HENRIQUES; SILVIA, 2016; PAPPAS et al., 2016).

É no decorrer ou logo após o nascimento que as leveduras deste gênero iniciam o processo de colonização nas mucosas de todos os seres humanos, como pele, trato gastrintestinal e reprodutivo (ACHKAR; FRIES, 2010). Por serem consideradas leveduras comensais, são capazes de se adaptarem rapidamente ao corpo humano e colonizá-lo sem causar o desenvolvimento de alguma doença em condições fisiológicas normais, ou seja, a candidíase somente irá se desenvolver quando houver um desequilíbrio entre o hospedeiro e este micro-organismo, sendo assim considerada uma infecção fúngica oportunista (MAYER; WILSON; HUBE, 2013; FERREIRA et al., 2015). Quando não oriundas da microbiota, as candidíases são consideradas exógenas, e muitas vezes classificadas até mesmo como uma doença sexualmente transmissível (DST) por alguns autores (BARBEDO; SGARBI, 2010, GUNTHER et al., 2014).

A classificação da doença pode variar de acordo com o local atingido. Quando capaz de atingir a corrente sanguínea (candidemia) e se disseminar para outros locais, a candidíase é considerada invasiva e, quando acomete apenas pele e/ou mucosa, superficial. Nos Estados Unidos da América (EUA), o gênero *Candida* sp. encontra-se entre os cinco patógenos mais envolvidos nos casos de infecções da corrente sanguínea, chegando a causar cerca de 8-10% das infecções nosocomiais (YAPAR, 2014). Cerca de 92% de todos os casos de candidemia são causados pelas cinco espécies já anteriormente citadas (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*), as quais podem distribuir-se de maneira diferente de acordo com a área geográfica e indivíduo e, embora a espécie *C. albicans* seja a mais frequentemente encontrada, há diferenças consideráveis nos casos envolvendo as espécies *C. glabrata* e *C. parapsilosis*. Os EUA e a maioria dos países europeus apresentam um maior número de casos envolvendo a espécie *C. glabrata* enquanto que Brasil e Espanha destacam quadros causados pela espécie *C. parapsilosis*. De uma maneira mais global, observa-se uma redução dos casos envolvendo a espécie *C. albicans*, enquanto que um aumento gradativo daqueles causados pela espécie *C. parapsilosis*. As taxas de mortalidade atribuídas a candidemia encontram-se em torno de 15-35% em adultos e 10-15% em neonatos e, apresentam custos de hospitalização de aproximadamente 40.000 dólares a cada episódio (GUINEA, 2014). No Brasil, os quadros de candidemia chegam a ser em média de 12 a 15 vezes maiores em relação a outros países como Estados Unidos (YAPAR, 2014).

## **2.2. A candidíase vulvovaginal (CVV)**

Os ambientes mais quentes e úmidos, como a cavidade oral e a vagina, são considerados os locais preferidos pelas espécies do gênero *Candida* sp. (SARDI et al., 2013). A candidíase cutaneomucosa pode ser dividida em não genital ou geniturinária. Entre as geniturinárias, a CVV é considerada a mais comum e acomete cerca de 75 % das mulheres adultas pelo menos uma vez durante a vida, podendo ou não apresentar episódios de recorrência (BONIFÁCIO et al., 2015; RAMOS et al., 2015; RATTI et al., 2015; SHERRY et al., 2017), enquanto que a candidúria, apesar de poder atingir ambos os sexos, costuma ser mais frequente em pacientes imunocomprometidos e neonatos. A CVV pode ser definida como os sinais e sintomas inflamatórios causados pela presença evidenciada desse micro-organismo e é a segunda causa considerada mais frequente de infecção genital, perdendo apenas para a vaginose bacteriana (BARBOSA et al., 2012; VAN SCHALKWYK et al., 2015). Quando esse quadro ocorre pelo menos quatro vezes durante o período de 1 ano, a candidíase é classificada como recorrente (CVVR) e, embora a *C. albicans* ainda seja considerada a espécie mais comum, o número de casos de CVVR causada por outras espécies ditas não-*albicans* vem aumentando (ACHKAR; FRIES, 2010; SOBEL, 2016).

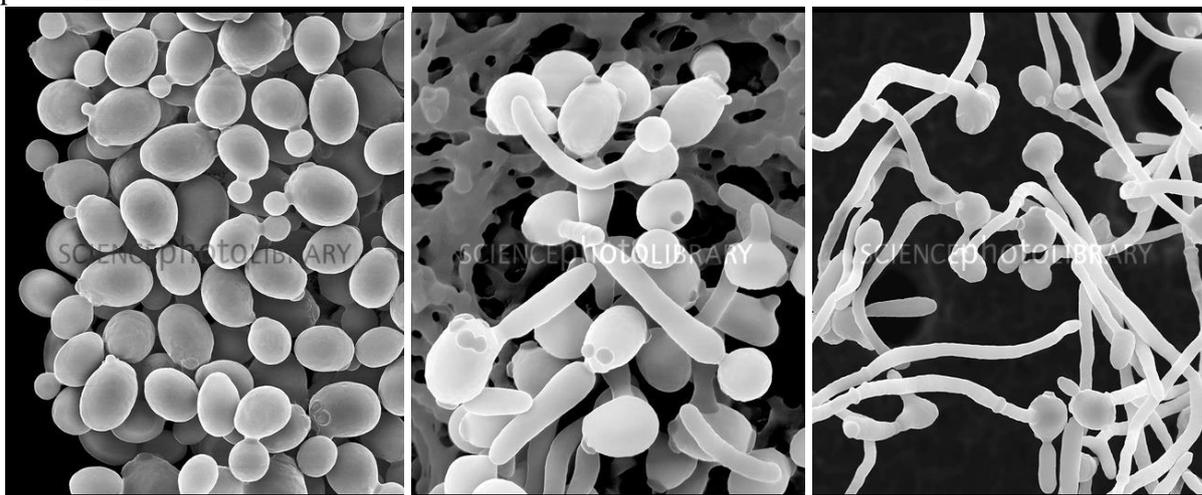
## **2.3. *Candida albicans***

Algumas espécies de *Candida* sp. limitam-se a determinadas regiões, enquanto outras, como a *C. albicans*, distribuem-se amplamente, além de ser considerada a espécie com maior relevância no que se diz respeito à taxa de prevalência em condições de normalidade e doença (MAYER; WILSON; HUBE, 2013; GARCIA-CUESTA; SARRION-PÉREZ; BAGÁN, 2014), sendo que cerca de 60% dos isolados de amostras clínicas mostram infecções causadas por esta espécie (BARBEDO; SGARBI, 2010).

Existem alguns fatores que são considerados imprescindíveis para o comportamento patogênico e a capacidade de invadir tecidos da espécie *C. albicans*. A morfogênese ou dimorfismo celular é a capacidade que esta espécie tem de se apresentar tanto na forma leveduriforme (uma única célula) quanto na forma de hifas e/ou pseudohifas (Figura 1). Alguns estudos relatam a presença de ambas as formas no interior de lesões, mas comprovam que mutantes capazes de se apresentar nas duas formas apresentam um maior grau de virulência em relação aos mutantes exclusivamente formadores de leveduras ou hifas. Além disso, quando o sistema imune do hospedeiro atua de maneira a combater determinada infecção fúngica e os macrófagos assumem seu papel de fagocitar as leveduras, estas são

capazes de lisar a célula fagocítica através da produção de filamentos. Portanto, o dimorfismo celular pode ser considerado uma estratégia para garantir a sobrevivência do fungo em condições não favoráveis (MUKAREMERA et al., 2017).

**Figura 1.** Microscopia eletrônica de varredura de *C. albicans* na forma de levedura, hifas e/ou pseudohifas.



Fonte: Science Photo Library, 2017a, b, c.

A capacidade da levedura se aderir tanto em superfícies bióticas como abióticas aumenta ainda mais seu fator de virulência. Ao se aderir, através proteínas de superfície celular especializadas, as adesinas, a levedura é capaz de invadir e se disseminar pelo organismo (CHAFFIN et al., 1998). A presença de receptores presentes na superfície da parede celular permite a interação com ligantes presentes em células hospedeiras e até mesmo em outras superfícies. Um exemplo é o receptor Hwplp, o qual se apresenta apenas nas superfícies de hifas e é capaz de se ligar ao epitélio (SHAH et al., 2014; ZHU; FILLER, 2010). Além disso, existem outros receptores, a exemplo do Eapl, que apresentam maior afinidade a superfícies abióticas como ao poliestireno (FILLER et al., 2006).

Outro fator de virulência considerado essencial é a produção e secreção de enzimas hidrolíticas, as quais são capazes de beneficiar o fungo ao provocar danos teciduais no hospedeiro, facilitando sua disseminação e se protegendo do sistema imune do hospedeiro. As principais são as fosfolipases (hidrolisam as ligações de um ou mais ésteres de glicerofosfolipídeos, encontrados na membrana celular do hospedeiro), proteases (hidrolisam proteínas importantes do hospedeiro, como colágeno, imunoglobulinas, citocinas próinflamatórias) e lipases (hidrolisam os lipídeos do hospedeiro) (ARAÚJO; HENRIQUES; SILVIA, 2016; SACHIN; RUCHI; SANTOSH, 2012).

Entre os quadros de candidíase não genitais, a candidíase oral constitui a infecção fúngica mais frequente entre os pacientes imunocomprometidos, principalmente os infectados com HIV (ACHKAR; FRIES, 2010). Diversos estudos apontam que cerca de 90% dos indivíduos soropositivos apresentam candidíase orofaríngea pelo menos uma vez na vida (BARBEDO; SGARBI, 2010; GARCIA-CUESTA; SARRION-PÉREZ; BAGÁN, 2014). A candidíase cutaneomucosa crônica geralmente acontece quando a resposta imune mediada por células do hospedeiro encontra-se debilitada, enquanto que a candidíase vaginal crônica também pode ser desencadeada por alguns fatores exógenos, como o uso de determinados medicamentos, principalmente antibióticos e contraceptivos orais, gestação, atividade sexual, que causa traumas de mucosa e, uso contínuo de roupas apertadas (MARCHAIM et al., 2012; PEIXOTO et al., 2014).

### **2.4. *Candida glabrata***

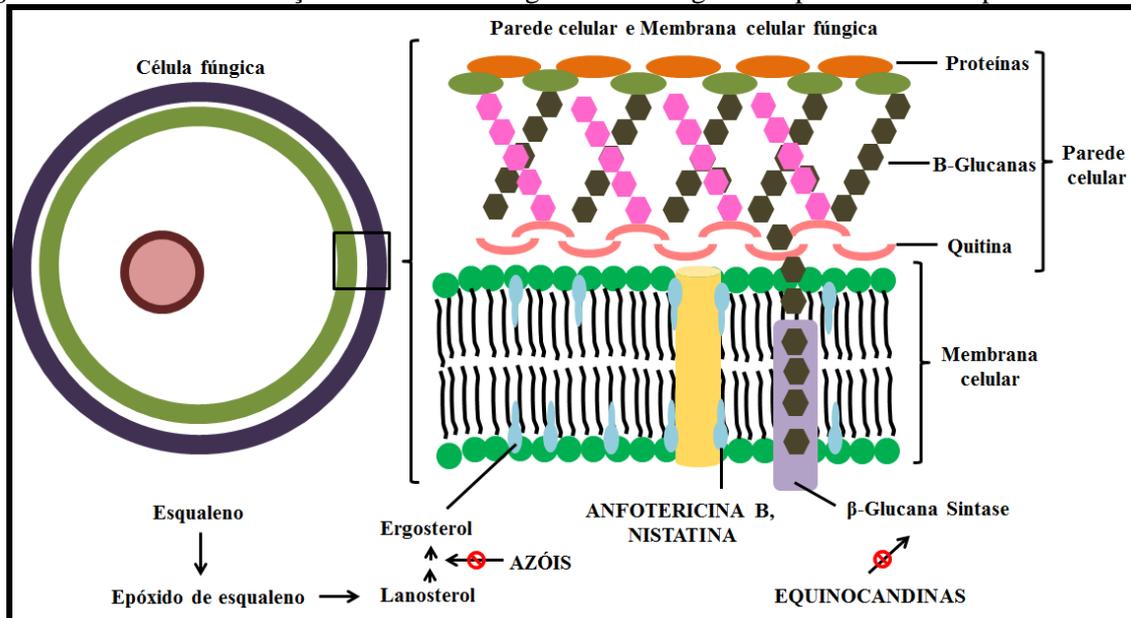
Dentre as espécies ditas não-*albicans*, a *C. glabrata* é considerada a segunda espécie mais envolvida nos quadros de CVV (KUCARÍKOVÁ et al., 2011; LIM et al., 2012; MERESTEIN et al., 2013). Durante muito tempo esta espécie foi considerada uma levedura não patogênica da microbiota normal de indivíduos saudáveis e geralmente não associada a infecções severas. Entretanto, o uso de imunossupressores associado ao tratamento com antibióticos de amplo-espectro resultou em um maior número de infecções sistêmicas e de mucosa causadas por esta espécie (MORETTI et al., 2013). Em comparação a outras espécies não-*albicans*, a *C. glabrata* apresenta elevada taxa de mortalidade, sendo mais comumente encontrada em indivíduos adultos. Das infecções causadas por mais de uma espécie de *Candida* sp., especialmente na candidose oral, cerca de 70% envolve as espécies *C. glabrata* e *C. albicans* (ARAÚJO; HENRIQUES; SILVA, 2016; SILVA et al., 2012).

### **2.5. Tratamento da CVV e resistência aos antifúngicos convencionais**

O tratamento das infecções fúngicas normalmente é feito com os derivados azólicos, os polienos e as equinocandinas, que possuem diferentes mecanismos de ação (Figura 2).

Os derivados azólicos apresentam como mecanismo de ação a inibição da enzima 14- $\alpha$ -lanosterol demetilase formada a partir do citocromo P450 e, por consequência, impede a formação do ergosterol, componente considerado essencial para a membrana da célula fúngica. Os principais representantes desta classe são: fluconazol, itraconazol, posaconazol, voriconazol e ravuconazol (triazóis) e o cetoconazol (imidazol).

**Figura 2.** Mecanismos de ação dos diferentes agentes antifúngicos disponíveis na terapia clínica.



Fonte: Autora.

A anfotericina B, antifúngico mais conhecido da classe dos polienos, é capaz de se ligar diretamente ao ergosterol tendo como consequência a perda de substâncias intracelulares importantes através dos poros que são formados. Este mecanismo irá causar morte celular, ou seja, a anfotericina B apresenta um efeito fungicida. A nistatina, também faz parte desta classe de antifúngicos, mas não pode ser utilizada sistemicamente devido ao seu elevado grau de toxicidade (COHEN, 2016). Em relação à seletividade da anfotericina B, pode-se dizer que esta pode causar danos nas células do hospedeiro, apresentando como um de seus principais efeitos colaterais a nefrotoxicidade (FALCI; ROSA; PASQUALOTTO, 2017).

Com o intuito de aumentar a seletividade às células de interesse (fúngicas), as equinocandinas (caspofungina) surgiram como a mais nova classe de antifúngicos, uma vez que atuam em componentes da parede celular exclusivamente de células fúngicas. Os antifúngicos desta classe são lipopeptídeos que apresentam como mecanismo de ação a interação com a  $\beta$ -(1,3) glucano sintase que, por consequência, inibe a síntese de  $\beta$ -(1,3) glucanas e perdendo a função da parede celular (ALEXANDER et al., 2013).

O tratamento da CVV geralmente é feito com derivados azólicos administrados por via oral ou tópica, contudo a exclusão dos fatores predisponentes e o tratamento adequado ao parceiro, quando transmitida sexualmente, tornam-se indispensáveis. Embora seja alto e cada vez mais moderno o avanço científico no que se diz respeito à terapia medicamentosa, a

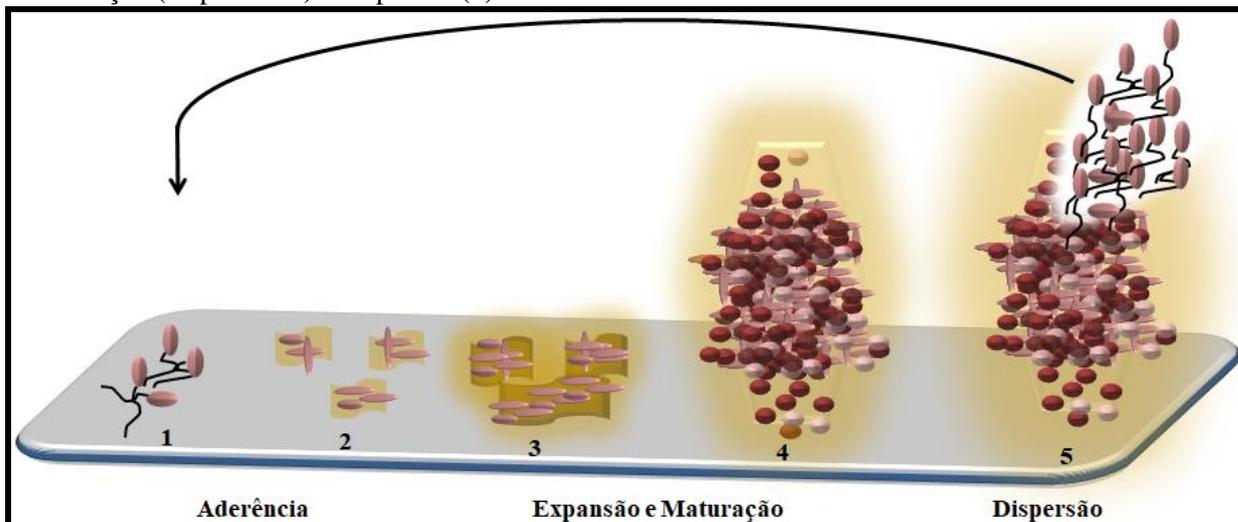
quantidade de espécies que apresentam sensibilidade reduzida a esta principal classe de antifúngicos ainda é considerada crescente e preocupante (LIU et al., 2014; FLOWERS et al., 2015; BOATTO et al., 2016). Além disso, os quadros de infecções causadas por cepas resistentes nas unidades de terapia intensiva são capazes de gerar um aumento do custo e mortalidade (BARAI et al., 2010; LUYT et al., 2014). Nos Estados Unidos da América, o diagnóstico e tratamento da CVV geram custos anuais de um bilhão de dólares (BARBOSA et al., 2012).

### **2.6. Biofilmes**

Dentre os diversos fatores de virulência apresentados pelas cepas microbianas, os biofilmes são frequentemente relatados. Os biofilmes se diferem das células planctônicas (células em suspensão) por se apresentarem na forma de uma comunidade de células ligadas umas as outras na presença de uma matrix composta por substâncias exopoliméricas, a qual é produzida como uma estratégia de proteção contra os fatores externos, como a ação de agentes antimicrobianos por impedir sua penetração, ou do sistema imune do hospedeiro. Estima-se que mais de 80% das infecções microbianas são causadas pela presença de biofilmes e não apenas de células planctônicas (REICHHARDT; STEVENS; CEGELSKI, 2016; SOLL; DANIELS, 2016).

A Figura 3 mostra o processo de formação do biofilme, o qual envolve algumas etapas: primeiramente na fase inicial (0-11 horas), as células planctônicas se aderem a uma determinada superfície, seja ela biótica ou abiótica, através da produção de adesinas específicas, enzimas que reconhecem ligantes na superfície e são capazes de promover a adesão. Então, inicia-se o processo de desenvolvimento do biofilme (entre 12 e 30 horas), no qual as células começam a multiplicar, sendo algumas espécies capazes até mesmo de formar pseudo-hifas e hifas. Além disso, ocorre a produção de uma matrix composta por polissacarídeos e proteínas, a matrix exopolimérica, a qual mantém as células aderidas umas as outras. Quando o biofilme já se encontra maduro (38 a 72 horas), ou seja, quando a matrix polimérica já é capaz de embeber completamente todas as camadas de células que compõe o biofilme, ocorre a fase de dispersão, onde há o desprendimento de leveduras deste biofilme já formado, as quais são capazes de migrar a outro local e dar início ao processo de formação de um novo biofilme (RAMOS et al., 2018).

**Figura 3.** Processo de formação de um biofilme microbiano através aderência (etapas 1 e 2), expansão e maturação (etapas 3 e 4) e dispersão (5).



Fonte: Autora.

A matriz exopolimérica funciona como uma estrutura de proteção (Figura 4) e, além disso, através dos canais água formados entre as células, é possível que nutrientes sejam transportados e resíduos sejam eliminados, garantindo a manutenção desta estrutura tridimensional (RAMOS et al., 2018).

**Figura 4.** Matriz exopolimérica envolvendo a levedura *C. albicans*.



Fonte: Science Photo Library, 2017d.

Alguns autores demonstram que biofilmes em modelos *in vivo* além de atingirem a fase de maturação mais rapidamente, são mais espessos (>100  $\mu\text{m}$ ) do que biofilmes formados em modelos *in vitro* (24-450  $\mu\text{m}$ ). Células formadoras de biofilmes são mais virulentas em

relação às células não formadoras, e assim, apresentam uma maior resistência aos antifúngicos. Esta característica pode estar relacionada tanto a presença da matriz exopolimérica, a qual se apresenta como uma barreira física, impedindo a penetração do agente antifúngico, ou até mesmo através dos diversos mecanismos desenvolvidos pelo micro-organismo para permitir sua excreção, a exemplo das bombas de efluxo (MARTINEZ; FRIES, 2010).

Células planctônicas também pode apresentar resistência aos agentes antifúngicos. Dentre os principais motivos, encontra-se a expressão de bombas de efluxo presentes na membrana, transportadores tipo ABC e pelos facilitadores (DOMINGUEZ; ANDES, 2017). Os genes CDR1, CDR2 e MDR1 quando expressos em *C. albicans* permitem a formação de bombas de efluxo. No entanto, a expressão de tais genes pode ser mediada durante o processo de formação do biofilme (WHALEY et al., 2017; SOUZA et al., 2015).

Cerca de 50% de todos os casos de candidemia em UTI envolvem a presença de cateteres, principalmente o cateter venoso central, considerado o principal fator de risco em pacientes com o sistema imune debilitado. Além disso, alguns estudos demonstram que a dificuldade de tratamento e aumento da taxa de mortalidade envolve a formação de biofilmes por estas espécies fúngicas nessas superfícies (BOUZA; GUINEA; GUEMBE, 2015). OBS

### **2.7. Plantas medicinais como novas fontes antimicrobianas**

A terapia antifúngica convencional, além apresentar uma série de efeitos colaterais, está sendo limitada pelo surgimento de cepas fúngicas cada vez mais resistentes, justificando significativamente a busca por novas moléculas com propriedades antifúngicas com maior espectro de ação, seletividade e menor toxicidade. Além disso, é extremamente desejável que além de apresentar atividade contra células planctônicas, tais moléculas possam também ser capazes de atuar em biofilmes já formados ou até mesmo inibir sua formação, uma vez que uma série de procedimentos médicos envolve a utilização de dispositivos internos por períodos relativamente longos. Alguns autores relatam forte atividade de determinado agente contra células planctônicas, mas pouca ou quase nenhuma contra biofilmes da mesma espécie, limitando ainda mais o arsenal terapêutico de produtos que sejam eficazes contra esta estrutura de resistência (GIRARDOT; IMBERT, 2016). Reichhardt, Stevens e Cegelshi (2016) publicaram um artigo de revisão no qual investigam minuciosamente os componentes da matriz exopolimérica de biofilmes fúngicos como uma estratégia para desenvolver antifúngicos que apresentem afinidade com algum componente e permitam uma maior

seletividade. Girardot e Imbert (2016) mencionam uma série de componentes antifúngicos de plantas medicinais de acordo com sua classificação fitoquímica, incluindo os terpenoides, compostos fenólicos, peptídeos, alcaloides e biossurfactantes.

Diante dessa situação, que vem se agravando de maneira significativa, a pesquisa por novas fontes que apresentem propriedades biológicas, incluindo as de origem natural como as plantas medicinais, vêm sendo cada vez mais incentivada por pesquisadores da área, os quais tem mostrado interesse não somente na caracterização biológica de extratos vegetais, mas também em sua análise fitoquímica de maneira a identificar a substância responsável pela propriedade de interesse (DAS et al, 2010; SAVOIA, 2012; KAUR; MONDAL, 2014).

Aliado a presença de uma ampla biodiversidade, pode-se dizer que o conhecimento popular foi e ainda é considerado a base na investigação de novas plantas com propriedades medicinais (OLIVEIRA et al., 2011; MAROYI, 2013), as quais apresentam diversas propriedades físico-químicas e biológicas mediadas pela presença de seus metabólitos secundários. Ainda assim, de acordo com dados presentes na literatura, é considerada baixa a porcentagem de plantas que são devidamente submetidas a estudos científicos, de modo a garantir eficácia e segurança durante sua utilização (BRESOLIN; FILHO, 2010; PEREIRA; CARDOSO, 2012; NASRI; SHIRZAD, 2013).

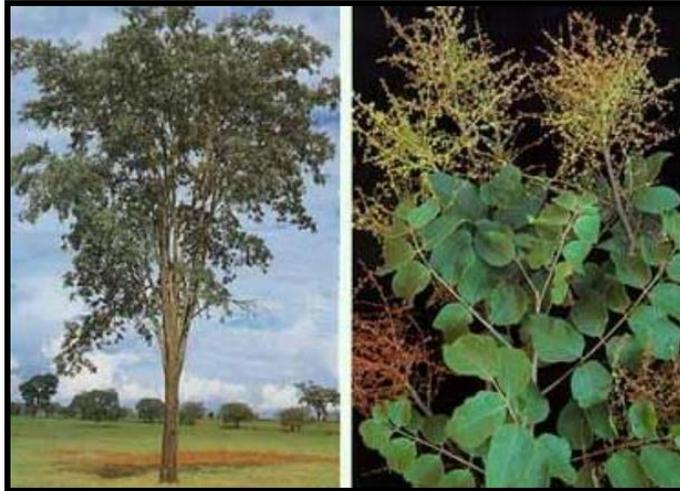
O processo de descoberta das propriedades biológicas das plantas medicinais envolve algumas estratégias tecnológicas que incluem o *screening* biológico, a descoberta e tentativa de isolamento da substância responsável pela atividade de interesse, além das triagens clínicas (BIBI et al., 2011). As plantas medicinais podem exibir diversos potenciais terapêuticos, entre eles, a atividade antimicrobiana contra uma série de micro-organismos considerados resistentes aos fármacos convencionalmente utilizados na terapia, fato que incentiva ainda mais a investigação desses agentes antimicrobianos de origem natural (DIAZ et al., 2010; WENDAKOON et al., 2012). Todos os anos, cerca de dois terços dos produtos químicos identificados são extraídos de plantas medicinais (AL-SNAFI, 2015). São vários os estudos encontrados na literatura que relatam a atividade antimicrobiana de extratos e óleos vegetais contra uma ampla variedade de bactérias, fungos e leveduras (AKTHAR; DEGAGA; AZAM, 2014). Além disso, os estudos que relatam também sua composição química e propriedades biológicas (*in vitro* e *in vivo*) que confirmem seus usos populares vêm se mostrando cada vez mais promissores (COSTA et al., 2010).

### **2.7.1. *Astronium urundeuva***

O gênero *Astronium*, pertencente à família Anacardiaceae, faz parte da lista de plantas estudadas no projeto Biota e apresenta como principais espécies o *A. fraxinifolium*, *A. graveolens* e o *A. urundeuva*. Estudos anteriores com o caule e as folhas mostraram que, dentre estas espécies, o extrato hidroetanólico das folhas do *A. urundeuva* mostrou-se mais promissor ao apresentar melhor atividade antifúngica contra espécies de *Candida* sp. (BONIFÁCIO et al., 2015). A espécie *Astronium urundeuva* (Allemao) Engl. (Figura 5), popularmente conhecida como aroeira-preta ou aroeira-do-sertão, se distribui principalmente na América do Sul, incluindo as regiões nordeste, sudeste e centro oeste, e está geralmente associada a ambientes secos do cerrado, savanas e caatingas. Apresenta uma pequena flor que é facilmente polinizada pelas abelhas e pelo vento (GAINO et al., 2010; MACHADO; OLVIERA, 2014). O porte da aroeira-preta pode variar de acordo com sua região de ocorrência, mas geralmente apresenta 30 metros de altura, inflorescência entre julho e setembro e, maturação dos frutos de setembro a outubro, os quais são compostos por uma semente única (NUNES et al., 2008).

O projeto Biota (FAPESP) intitulado “Fitoterápicos padronizados para o tratamento de doenças crônicas” envolve diversos pesquisadores das mais diversas áreas e tem como objetivo principal estudar de maneira mais profunda algumas plantas a fim de facilitar o desenvolvimento de novos fármacos fitoterápicos. Este projeto encontra-se em consonância com a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos do Ministério da Saúde, a qual visa proporcionar alternativas terapêuticas para a população a partir de plantas medicinais. Dessa maneira, alguns benefícios poderiam ser trazidos à população, como por exemplo, o acesso aos medicamentos de maneira mais fácil, além da inclusão social e regional. Entretanto, para que estes benefícios sejam realmente colocados em prática, é indispensável que alguns fatores sejam levados em consideração, como a preservação do conhecimento tradicional da população que faz uso das plantas medicinais, bem como o uso sustentável da biodiversidade (ANVISA, 2012). Além disso, para que qualquer produto fitoterápico seja utilizado de maneira segura e eficaz, se faz necessária a identificação exata de seus constituintes fitoquímicos bem como sua análise farmacológica e toxicológica (SILVA et al., 2011; DUTRA et al., 2016).

**Figura 5.** Planta *A. urundeuva* (Allemao) Engl.



Fonte: Lorenzi, 2008.

É uma das principais plantas utilizada na medicina tradicional nordestina para o tratamento de várias doenças (CUNHA et al., 2009). O extrato aquoso do caule é bastante utilizado sob a forma de semicúpio (“banho-de-assento”) após o parto. Além disso, também é indicada no tratamento de gastrites, úlceras gástricas, cervicites, vaginites, hemorroidas (LORENZI, 2008) e como anti-inflamatório e cicatrizante natural (PINHO et al., 2012; HERNÁNDEZ et al., 2013).

A planta *A. urundeuva* apresenta diversas propriedades terapêuticas, as quais são justificadas pela presença de seus principais constituintes fitoquímicos, como taninos hidrolisáveis e condensados, além dos óleos essenciais, os quais justificam o aroma típico encontrado nas folhas desta espécie (CUNHA et al., 2009; CARLINI et al., 2010). Foram identificados cerca de 16 constituintes voláteis, entre eles, o  $\alpha$ -pineno,  $\gamma$ -terpineno, o  $\delta$ -3-careno e o  $\beta$ -cariofileno, considerado o principal constituinte (SÁ, 2008; COSTA et al., 2014). Souza et al. (2007) comprovaram o efeito anti-inflamatório e antiulcerogênico de uma fração do caule desta espécie enriquecida em taninos.

Embora existam alguns estudos que comprovem tais propriedades, não há relatos na literatura sobre quais os principais componentes das folhas de *A. urundeuva* responsáveis pela atividade antifúngica frente às duas espécies de *Candida* sp. mais envolvidas nos quadros de infecções fúngicas, especialmente na CVV: *C. albicans* e *C. glabrata*, o que impulsiona ainda mais as pesquisas direcionadas à triagem fitoquímica na tentativa de identificar as substâncias que apresentam suas propriedades biológicas, em especial, a antifúngica.

### 2.8. Sistemas nanoestruturados

Muitas vezes, determinada substância que apresente alguma atividade biológica de interesse pode também apresentar determinadas características próprias que impeçam sua utilização, como por exemplo, ao apresentar propriedades indesejáveis e/ou comportamento não tão desejado em meio biológico. Além disso, também podem apresentar problemas durante o processo de formulação, ao serem incompatíveis com os demais componentes ou até mesmo pelo fato de não suportarem a presença de outro componente ativo nesta mesma formulação (BHARATE; BHARATE; BAJAJ, 2010).

A nanotecnologia vem surgindo como uma alternativa promissora e bastante desejada no tratamento de diversas doenças, pois é capaz de driblar a grande maioria dos obstáculos que surgem durante o processo de formulação. Além disso, os sistemas nanoestruturados são capazes de aprimorar o comportamento biológico de diversos ativos e podem até mesmo controlar de maneira eficiente sua liberação com vetorização diferenciada para determinados tecidos ou órgãos do organismo aumentando sua seletividade. Todas essas estratégias que permitem a redução da dose total necessária a fim de se garantir uma redução dos efeitos colaterais indesejados, além de controlar a liberação do ativo tem chamado atenção das indústrias e comunidade científica (BOURZAC, 2012; GRILL et al., 2009; VENUGOPAL et al., 2009).

Além de permitir a utilização de ativos que antigamente eram impedidos de serem utilizados, os sistemas nanoestruturados podem aprimorar ativos já utilizados que frequentemente apresentam algumas inconveniências. Por exemplo, além da incorporação de substâncias com caráter hidro ou lipofílico, os sistemas nanoestruturados são capazes de proteger ativos da degradação térmica ou fotodegradação, agir como sistemas reservatórios e diminuir o grau de toxicidade (BONIFÁCIO et al., 2014).

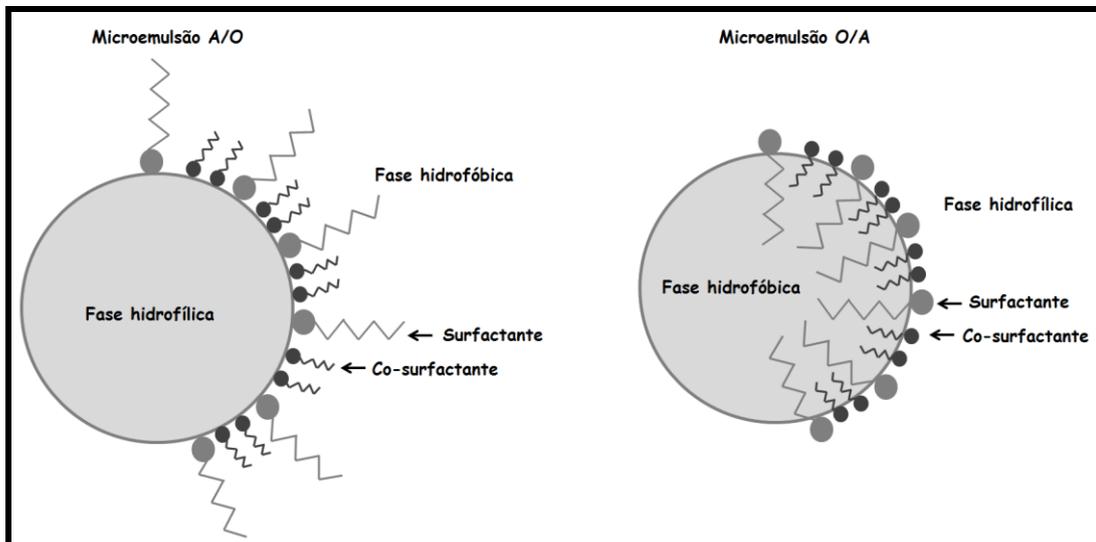
O uso da nanotecnologia como uma estratégia de aprimorar a atividade dos mais diversos constituinte vem sendo utilizado nas mais diversas áreas, incluindo até mesmo a fitoterapia (WANG et al., 2016). Alguns autores relataram na literatura a utilização de sistemas nanoestruturados com o intuito de potencializar a ação de alguns extratos de plantas, de forma a diminuir a dose requerida e, conseqüentemente, os efeitos indesejáveis (GHOSH et al., 2013; RAJENDRAN et al., 2013).

Alguns estudos encontrados na literatura relatam como principais componentes majoritários no extrato de *Astronium* sp, os taninos, óleos essenciais, flavonoides, entre

outros, frequentemente associados a propriedades antimicrobianas (DAS et al., 2010). O aumento da afinidade entre ativo *versus* alvo é extremamente interessante, pois permitirá uma liberação mais direcionada aumentando sua biodisponibilidade (PARK, 2014).

Entre os mais diversos sistemas nanoestruturados, as microemulsões (ME) se apresentam como o exemplo clássico. São normalmente definidas como emulsões transparentes, nas quais são encontradas gotículas na ordem de nanômetros (nm) cercadas por um componente externo de diferente grau de hidrofília/lipofilia (FANUN, 2012). Caso essas microgotículas sejam de óleo em água (O/A) ou de água em óleo (A/O), esse sistema pode ser considerado termodinamicamente estável devido à presença de um terceiro componente, o tensoativo, considerado extremamente essencial para a formação de uma microemulsão, pois é ele quem irá permitir que tais componentes permaneçam na mesma formulação. Em algumas situações, a utilização de um determinado tensoativo não resulta na presença de gotículas da ordem de nanômetros e, assim, se faz necessária a presença de um co-tensoativo que irá auxiliar a formação de gotículas do tamanho exigido para ser classificado como um sistema nanoestruturado e, assim, aprimorar o efeito terapêutico (MARTIN et al., 2015). Justamente por apresentarem tamanhos diferentes de gotículas, as MEs se diferem das emulsões, as quais são classificadas como sistemas microestruturados que apresentam gotículas maiores que a escala manométrica. Acredita-se que tal diferença de tamanho é capaz de alterar a capacidade biológica do ativo incorporado, influenciando na solubilidade e, conseqüentemente, na eficácia (McCLEMENTS, 2012).

**Figura 6.** Gotículas formadas em uma microemulsão água óleo (A/O) e óleo água (O/A) devido a presença de surfactante e co-surfactante, os quais estão posicionados de acordo sua afinidade com a fase interna/externa.



**Fonte:** Adaptado de Silva et al., 2014.

Atualmente existem no mercado, algumas formulações contendo antifúngicos já comercializados, que foram desenvolvidas com o objetivo de melhorar as vantagens ou reduzir os efeitos colaterais destes fármacos já disponíveis no mercado. Na tentativa de reduzir o principal efeito colateral da anfotericina B convencional (toxicidade), o Ambisome<sup>®</sup> surgiu no mercado e se apresenta na forma de um composto lipossomal unilamelar contendo esse ativo. Sua formulação é composta de fosfatidilcolina de soja hidrogenada, distearoilfosfatidilglicerol e colesterol. Entretanto, a utilização destas novas formulações ainda é considerada um desafio pelos centros médicos públicos em virtude do seu elevado custo de produção, custando cerca de 20 vezes mais caro que sua forma convencional (AVERSA et al., 2017).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

O objetivo deste trabalho é detalhar os estudos direcionados à atividade antifúngica do extrato hidroetanólico das folhas de *A. urundeuva* (Allemao) Engl..

#### **3.2. Objetivos específicos**

- ✓ Realizar o perfil fitoquímico e fracionamento do extrato hidroetanólico das folhas de *A. urundeuva*;
- ✓ Determinar a atividade antifúngica *in vitro* do extrato, frações e/ou substância(s) isolada(s) do extrato frente à *Candida albicans* e *Candida glabrata*, incluindo cepas padrão e isolados clínicos;
- ✓ Quantificar a(s) substância(s) isolada(s) no extrato envolvida(s) na atividade antifúngica;
- ✓ Incorporar no sistema lipídico nanoestruturado a amostra vegetal obtida no fracionamento que mostrar-se mais efetiva frente às cepas fúngicas;
- ✓ Avaliar a eficácia da amostra vegetal contra as cepas de *C. albicans* e *C. glabrata* incluindo isolados clínicos com variados níveis de resistência frente alguns dos agentes antifúngicos mais frequentemente utilizados;
- ✓ Realizar estudos de combinação com a amostra vegetal e os agentes antifúngicos comumente utilizados, como anfotericina B, fluconazol e equinocandina;
- ✓ Avaliar a atividade da amostra vegetal contra biofilmes de *C. albicans* e *C. glabrata*, incluindo a habilidade de inibir a formação do biofilme, além de sua atividade contra biofilmes pré-formados;
- ✓ Verificar o potencial de desenvolvimento de resistência das duas cepas de *Candida* sp. quando expostas a amostra vegetal por um determinado período de tempo;
- ✓ Determinar a citotoxicidade da amostra vegetal utilizando células normais VERO, MRC5 e HaCaT;
- ✓ Avaliar a toxicidade aguda da amostra vegetal frente à *Artemia salina* L. (Artemiidae);
- ✓ Avaliar a eficácia da amostra vegetal frente a um modelo experimental *in vivo* de CVV;
- ✓ Determinar a atividade antifúngica *in vitro* do extrato frente as espécies de *Cryptococcus* sp. e também alguns fungos filamentosos.

### 4. MATERIAL E MÉTODOS

#### 4.1. Obtenção e procedência do extrato vegetal

O processo de obtenção do extrato hidroetanólico das folhas de *A. urundeuva* foi realizado no Laboratório de Fitoquímica (Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química de Araraquara da Universidade Estadual Paulista – UNESP), pelo pós graduando Leonardo Perez de Souza, sob supervisão do Prof. Dr. Wagner Vilegas.

As folhas de *A. urundeuva* foram coletadas em viagens de campo no dia 28 de novembro de 2007 na cidade de Bálsamo (SP). A identificação da espécie vegetal foi feita pelo Prof. Dr. Jorge Tamashiro (Departamento de Biologia Vegetal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP) e a exsiccata foi posteriormente depositada no herbário da universidade com o número de registro 1444. Esta pesquisa possui autorização para atividades com finalidade científica concedida pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (número 42572-2).

O material vegetal foi submetido à secagem em estufa (40 °C e circulação de ar) durante 7 dias e moagem realizada em moinhos de facas. O extrato hidroetanólico 70% foi obtido através da técnica de percolação simples exaustiva, utilizando-se como referência para o esgotamento da extração, a coloração do extrato (SIMÕES et al., 2010). Inicialmente a droga vegetal pulverizada (884 g) foi intumescida com etanol 70% (v/v, 2 L) durante 2 horas e, após esse período, com a droga vegetal já intumescida, o percolador foi empacotado de forma homogênea, a fim de evitar a formação de bolhas ou buracos no conteúdo alocado dentro do percolador. Obedeceu-se a proporção de 5:1 (volume percolador : volume de droga vegetal intumescida), com vazão entre 1 e 2 mL/min/Kg da amostra vegetal, que apresentou tamanho médio de partícula de 1 a 3 mm. Após o processo de extração, a solução extrativa foi filtrada e concentrada em evaporador rotativo sob pressão reduzida (50 °C) e, em seguida, transferida para frascos de vidros tarados, que permaneceram em capela para secagem prévia sob fluxo de ar. A secagem foi finalizada em dessecador com sílica gel sob pressão reduzida e, quando necessário, os extratos foram liofilizados para a completa remoção de água.

### 4.2. Fracionamento do extrato vegetal

Bonifácio et al. (2015) mostraram através de ensaios microbiológicos que o extrato das folhas de *A. urundeuva* apresenta significativa atividade antifúngica contra a levedura *C. albicans* e, na tentativa de descobrir quais os componentes envolvidos nesta atividade biológica, o extrato foi submetido ao fracionamento biomonitorado. Os experimentos relacionados a descoberta das substâncias responsáveis por esta propriedade biológica foram realizados no Laboratório de Farmacognosia (Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade Estadual Paulista – UNESP) em colaboração com o aluno de doutorado Flávio Alexandre Carvalho, sob supervisão do Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos.

Inicialmente, o extrato seco foi submetido a uma partição líquido-líquido (PLL) (**item 4.2.1**) de maneira a se obter duas fases: a fase aquosa (FA) e a fase orgânica (FO). Então, a fase que apresentou melhor atividade antifúngica, avaliada através dos ensaios microbiológicos, foi novamente fracionada, desta vez por extração em fase sólida (EFS) em fase reversa (**item 4.2.2**). Todas as fases e frações obtidas foram analisadas utilizando-se cromatografia em camada delgada (CCD). Inicialmente as condições de separação foram otimizadas em pequena escala a fim de se estabelecer condições mais apropriadas e evitar qualquer perda de amostra. Depois de estabelecidas, as condições foram ajustadas para a maior escala, conforme dados apresentados na Tabela 1.

Além disso, para aprimorar a determinação das substâncias majoritárias em uma mistura, foram utilizados outros métodos analíticos, incluindo Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , bem como consulta à literatura científica especializada.

**Tabela 1.** Condições utilizadas durante a partição líquido-líquido (PLL) e a extração em fase sólida (EFS) em diferentes escalas.

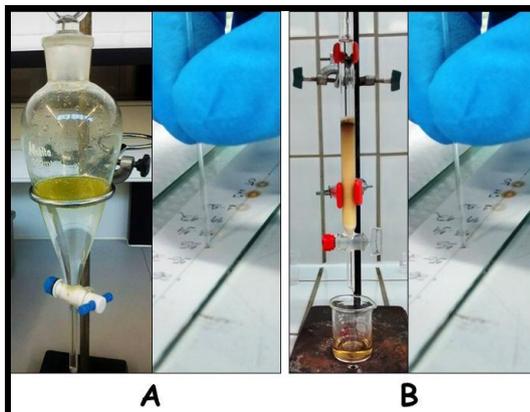
| Condição | Escala                                |       |      |
|----------|---------------------------------------|-------|------|
|          | Menor                                 | Maior |      |
| PLL      | Massa do extrato (mg)                 | 200   | 2000 |
|          | Volume de FA (mL)                     | 200   | 1000 |
|          | Volume de FO (mL)                     | 100   | 500  |
| EFS      | Massa da FA (mg)                      | 260   | 1890 |
|          | Diâmetro da coluna (cm)               | 1,3   | 4,7  |
|          | Altura de sílica C <sub>18</sub> (cm) | 10    | 10   |
|          | Volume de eluente (mL)                | 26    | 340  |

FA: fase aquosa; FO: fase orgânica

#### 4.2.1. Partição Líquido-Líquido (PLL)

Na PLL em menor escala, o extrato hidroetanólico seco das folhas de *A. urundeuva* (200 mg) foi solubilizado em uma mistura de 80 mL de etanol e 120 mL de água deionizada, correspondente à FA e transferido para um funil de separação (Figura 7A). Neste, foram adicionados 100 mL de hexano, correspondente à FO, e agitou-se cuidadosamente a fim de garantir a separação dos componentes do extrato de acordo com sua polaridade. A FO foi recolhida em um béquer de grande superfície de contato e a FA foi extraída mais duas vezes com 100 mL de hexano em cada etapa. A FA resultante das extrações anteriores também foi recolhida e armazenada em um béquer de grande superfície de contato. As fases foram secas em capela à temperatura ambiente e, quando necessário, em dessecador com sílica gel sob pressão reduzida. O conteúdo das FA e FO foi transferido para frascos menores previamente tarados a fim de verificar o rendimento e armazenados em geladeira. Posteriormente, as FA e FO obtidas foram solubilizadas em metanol (5 mg/mL) e submetidas à análise por CCD (item 4.2.3). A PLL em maior escala foi realizada segundo o mesmo método descrito, conforme dados da Tabela 1.

**Figura 7.** Etapas utilizadas no fracionamento do extrato hidroetanólico das folhas de *A. urundeuva* por partição líquido líquido (A) e extração em fase sólida (B) com posterior análise por cromatografia em camada delgada.



Fonte: Autora.

As amostras vegetais até então obtidas (extrato livre, FO, FA) foram submetidas ao ensaio de atividade antifúngica através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) (**item 4.3**) para que dessa forma se pudesse identificar em qual das fases obtidas da PLL encontravam-se as substâncias responsáveis pela atividade antifúngica e assim, dar continuidade ao biofracionamento do extrato.

#### 4.2.2. *Extração em Fase Sólida (EFS)*

Foi realizada uma EFS 1 com 260 mg da fase mais ativa obtida através da PLL. A amostra foi aplicada em uma coluna de vidro contendo 10 cm de sílica de fase ligada C<sub>18</sub> (50 µm) na proporção 1:25 (m/m) (Figura 7B). A eluição (volume de eluente = 26,0 mL) foi realizada sob pressão com metanol e água deionizada, e conforme mostra a Tabela 2, após a análise por CCD (**item 4.2.3**) das frações obtidas na primeira tentativa de separação (EFS 1), as proporções entre os solventes metanol e água foram ajustadas (EFS 2). Depois de estabelecida a melhor condição de separação, as frações obtidas foram secas sob fluxo de ar em capela e em dessecador com sílica gel sob pressão reduzida, quando necessário. A extração em fase sólida em maior escala (EFS 3) foi realizada segundo o mesmo método descrito, conforme dados da Tabela 1.

**Tabela 2.** Gradientes utilizados durante as extrações em fase sólida (EFS) para a obtenção das frações.

| Gradiente da EFS (metanol/água) |        |               |
|---------------------------------|--------|---------------|
| Fração                          | EFS 1  | EFS 2 / EFS 3 |
| 1                               | 50:50  | 50:50         |
| 2                               | 60:40  | 53:47         |
| 3                               | 70:30  | 55:45         |
| 4                               | 80:20  | 58:42         |
| 5                               | 85:15  | 60:40         |
| 6                               | 90:10  | 70:30         |
| 7                               | 95:5   | 100:00        |
| 8                               | 100:00 | --            |

As frações obtidas foram analisadas por técnicas cromatográficas e analisadas quanto a sua atividade antifúngica

#### 4.2.3. *Análise por cromatografia em camada delgada (CCD) do extrato vegetal, fases obtidas da PLL e frações obtidas por EFS*

A análise por CCD do extrato, FO, FA e frações da fase mais ativa (5,0 mg/mL, metanol) foi desenvolvida em placas de vidro cobertas com sílica gel 20 x 20 cm x 0,25 mm (Sigma-Aldrich®). Foi realizada uma otimização da força de eluição e da seletividade da fase móvel (FM) variando a proporção e o tipo de solventes conforme o comportamento das frações (Tabela 3), de modo a selecionar a melhor FM. As placas foram reveladas com anisaldeído sulfúrico e colocadas em estufa a 110 °C durante 10 minutos. Diante de alguns dados encontrados na literatura que sugerem a presença de taninos nas folhas de *A. urunudeva* (MACHADO; OLIVEIRA, 2014), as placas também foram reveladas com solução metanólica de cloreto férrico 1% para que as frações pudessem ser comparadas com padrão de ácido gálico (Sigma-Aldrich®) (1,0 mg/mL, metanol) e também para obter um perfil em CCD dos taninos hidrolisáveis.

**Tabela 3.** Fases móveis testadas para cromatografia em camada delgada (CCD).

| Composição da fase móvel                    | Proporção                    |
|---|------------------------------|
| hexano:acetato de etila                     | 95:5                         |
| hexano:acetato de etila:isopropanol         | 70:28:2                      |
| acetato de etila:acetona:ácido acético:água | 6:2:1:1                      |
| tolueno:acetato de etila:ácido fórmico      | 2,4:5,6:2,0                  |
| hexano:acetato de etila:isopropanol         | 60,0:37,3:2,7                |
| benzeno:acetato de etila:metanol            | 55:35:10; 50:30:20; 50:35:15 |

As frações da fase mais ativa, obtidas através da EFS, foram submetidas ao ensaio de atividade antifúngica.

#### 4.2.4. Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta (UV)

Para a espectroscopia de absorção no ultravioleta (UV), utilizou-se o espectrofotômetro UV-Vis modelo UV-1800 (Shimadzu®), utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. As amostras (extrato, FO, FA e todas as frações da EFS) foram solubilizadas em metanol grau HPLC inicialmente na concentração de 0,5 mg/mL. O metanol foi utilizado como branco. As concentrações das amostras para leitura das absorbâncias (190-800 nm) foram (mg/mL): extrato e FA (0,0375), FO (0,1), frações 1 e 2 (0,0375), frações 3 a 7 (0,075) e ácido gálico (0,0125).

#### 4.2.5. Análise por CLAE-DAD do extrato vegetal e fração mais ativa no modo analítico

Antes da análise por CLAE-DAD, as amostras (extrato vegetal e fração mais ativa - 5 mg/mL; metanol : água 1:1, v/v) foram submetidas ao *clean up* utilizando cartucho de EFS preenchido com sílica de fase reversa StrataTM C<sub>18</sub>-E; 15 x 10 mm, 55 µm (Phenomenex®). O cartucho foi primeiramente ativado com metanol 100% (8 mL). As amostras foram eluídas com 4 mL de metanol:água (1:1, v/v) sob pressão e depois novamente com mais 5 mL de metanol:água (95:5, v/v). Após a secagem em capela, as amostras foram pesadas, solubilizadas em metanol (1 mg/mL) e filtradas em membrana 0,22 µm, PVDF (Millipore®).

Para registrar os cromatogramas do extrato e da fração mais ativa, utilizou-se cromatógrafo líquido de alta eficiência (analítico, gradiente quaternário) modelo PU-2089 (Jasco®), acoplado a detector de arranjo de foto diodos com faixa de varredura de 195-650 nm

e intervalo mínimo de 1 nm, modelo MD-2010 (Jasco<sup>®</sup>). Para a aquisição e processamento dos dados cromatográficos foi utilizado o software EZChrom Elite Client/Server versão 3.1.7 (Chromatec<sup>®</sup>). As análises foram realizadas utilizando uma coluna Luna C<sub>18</sub> (Phenomenex<sup>®</sup>) de 250 x 4,6 mm de diâmetro interno, apresentando partículas com tamanho médio de 5 µm protegida com uma coluna de guarda (Phenomenex<sup>®</sup>) de 4 x 3 mm de diâmetro interno. A FM foi constituída de metanol:água utilizando-se um gradiente de 5-50% de metanol por 30 min e de 50-100% por 5 min, com vazão de 1 mL/min. As amostras foram injetadas através de um injetor 7125 (Rheodyne<sup>®</sup>) com um *loop* de 100 µL.

#### **4.2.6. Isolamento de substâncias a partir da fração mais ativa com o emprego de CLAE preparativo de fase reversa**

Ainda na tentativa de identificar as substâncias responsáveis pela atividade antifúngica, a fração mais ativa foi submetida à CLAE no modo preparativo. Após o estabelecimento da condição de FM em CLAE modo analítico (C<sub>18</sub> 250 x 4,6 mm; 5 µm; 0,4 mL/min; 272 nm; 3 mg/mL; 20 µL), a fração (200 mg) foi submetida a separação por CLAE modo preparativo. As análises da fração (10 mg/mL; metanol : água 4:6, v/v; filtração em membrana PVDF 0,22 µm) foram realizadas utilizando coluna de fase reversa Agilent Eclipse XDB C<sub>18</sub>; 250 x 21,20 mm; 7 µm (Zorbax<sup>®</sup>), gradiente linear de 15-60% metanol : água (v/v) em 60 min com vazão de 8,0 mL/min, volume de injeção de 1 mL e detecção a 272 nm. Após a coleta de todos os picos presentes na fração mais ativa, as amostras foram concentradas em rotaevaporador e posteriormente liofilizadas. Diante da incerteza de que os picos coletados durante a CLAE modo preparativo estavam puros, optou-se por nomear cada um deles de subfração. De maneira a identificar a subfração mais ativa, todas as subfrações obtidas também foram analisadas quanto a sua atividade biológica.

#### **4.2.7. Determinação estrutural das substâncias da subfração mais ativa**

##### **4.2.7.1. Espectrometria de massa**

A análise por espectrometria de massa (EM) da subfração mais ativa foi realizada utilizando um cromatógrafo líquido acoplado a espectrômetro de massa micrOTOFTM- Q II da (Bruker Daltonics<sup>®</sup>), com voltagem do capilar de 3,5 kV, temperatura de dessolvatação de 180 °C, como gás de colisão o nitrogênio. Utilizou-se como padrão de calibração o [TFA+Na]<sup>+</sup>. As análises foram realizadas no modo negativo no Núcleo de Apoio à Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS), em colaboração com o Prof. Dr. Noberto P.

Lopes (Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – USP).

### 4.2.7.2. Ressonância Magnética Nuclear de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$

As análises de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da subfração mais ativa foram realizadas no espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Fourier 300 MHz (7,0 T) (Bruker®). A amostra foi dissolvida em  $\text{CD}_3\text{OD}$ , sendo empregado TMS como padrão interno.

### 4.2.8. Quantificação das substâncias identificadas no extrato das folhas de *A. urundeuva*

A quantificação dos componentes foi realizada através de CLAE-UV utilizando calibração com padrão externo. O método utilizado foi FM: ACN (B) e  $\text{H}_2\text{O}$  + Ác. Acético 0,1% (A). Coluna Thermo Scientific®  $\text{C}_{18}$  (250 x 4,6 mm; 5  $\mu\text{m}$ ), HPLC (Perkin Elmer®), fluxo 1,0 mL/min,  $\lambda = 272$  nm, Sistema de eluição gradiente: 15-60% B (60 min). As curvas analíticas foram construídas utilizando-se padrões comerciais de ácido gálico (Sigma® - 97,9%), galato de metila (Fluka® - 98%) e galato de etila (Sigma® - 96%). Inicialmente, foi preparada uma solução estoque [concentração de 0,5 mg/mL em  $\text{H}_2\text{O}$ :ACN (6:4, v/v)] de cada padrão e, a partir desta foram realizadas diluições seriadas para a obtenção de 7 níveis de concentração (0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125; 0,015625; 0,0078125 mg/mL).

### 4.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente às cepas de *C. albicans* e *C. glabrata*

Primeiramente as amostras foram solubilizadas em 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 90% de caldo sabouraud dextrose (CSD) na concentração de 2000  $\mu\text{g/mL}$ . A CIM foi determinada pela técnica de diluição em microplacas (96 orifícios) obedecendo-se a norma M27-A3 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI -2008) e Duarte et al. (2005), com modificações como descritas abaixo. Os orifícios da microplaca (96 poços), previamente preenchidos com 100  $\mu\text{L}$  de RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) (tamponado com MOP's), receberam 100  $\mu\text{L}$  da amostra vegetal. Então, foi realizada a diluição seriada e depositado 100  $\mu\text{L}$  da suspensão fúngica em cada orifício. Foram realizados também os controles do meio de cultura, crescimento fúngico, amostras vegetais, negativo [solvente utilizado para o extrato livre (DMSO) e incorporado (ME base)] e, positivo [anfotericina B (160  $\mu\text{g/mL}$ ) e o fluconazol (256  $\mu\text{g/mL}$ )]. As microplacas foram incubadas por 48 horas a 37

°C e, após este período, procedeu-se a leitura de absorvância (595 nm) através de um espectrofotômetro (Cytation Biotek®) de microplacas (GUDIÑA et al., 2010). A CIM foi definida como a menor concentração de amostra capaz de inibir  $\geq 90\%$  da multiplicação microbiana (HÖRNER et al., 2008; HAWSER; ISLAM, 1999).

Após a leitura espectrofotométrica, determinou-se a concentração fungicida mínima (CFM), onde a mistura de cada poço da microplaca foi replicada, com o auxílio de hastes de madeira estéreis, em uma placa de ágar sabouraud dextrose (ASD). Após incubação das placas (37 °C) por 48 horas, os resultados foram comparados com os obtidos na leitura da microplaca, onde foi observada a presença ou ausência de crescimento das leveduras.

Além disso, foi também realizada a leitura visual com o revelador cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) – 2%, onde foram adicionados 20 µL em cada poço da microplaca, posteriormente incubada a 37 °C por 2 horas. Os resultados foram analisados de acordo com a mudança de coloração, onde os poços que apresentaram coloração vermelha indicaram a presença de crescimento fúngico, enquanto que aqueles que permaneceram incolores indicaram a ausência de crescimento fúngico, ou seja, atividade antifúngica da amostra testada (DUARTE et al., 2005). Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Além das cepas padrão *C. albicans* (ATCC 10231 e SC5314) e *C. glabrata* ATCC 2001, também foi testada uma cepa clínica para cada espécie, conforme listadas abaixo (Tabela 4).

As cepas clínicas utilizadas foram cedidas pela Profa. Dra. Margarete Teresa Gottardo de Almeida (Laboratório de Microbiologia do Departamento de Doenças Dermatológicas, Infeciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP).

**Tabela 4.** Relação de cepas clínicas de *Candida* sp. com perfil de susceptibilidade e padrões clínicos.

| Amostra | Espécie            | Origem           | Clínica       | Resistência        | Sensibilidade  |
|---------|--------------------|------------------|---------------|--------------------|--|
| CAV 3   | <i>C. albicans</i> | Secreção vaginal | Sintomática   | Derivados de azóis | Anfotericina B                                       |
| CGV 3   | <i>C. glabrata</i> | Secreção vaginal | Assintomática | Fluconazol         | Anfotericina B, cetoconazol, itraconazol, fluconazol |

#### 4.4. Incorporação das amostras vegetais no sistema nanosestruturado

Os experimentos de formulação do sistema nanoestruturado (microemulsão - ME) e incorporação das amostras foram realizados no Laboratório de Farmacotécnica (Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP) em colaboração com a aluna de pós-doutorado Patrícia Bento da Silva, sob supervisão do Prof. Dr. Marlus Chorilli

Após a possível descoberta da subfração responsável pela atividade antifúngica do extrato, as amostras (extrato, subfração ativa e possível substância identificada) foram incorporadas em duas MEs: a primeira (ME A) constituída por 10% de fase oleosa - FOI (colesterol), 10% de tensoativo - T [polioxietileno 20-cetil éter (Brij 58<sup>®</sup>) e fosfatidilcolina de soja, na proporção de 2:1] e 80% de fase aquosa - FA (tampão fosfato pH=7,4), preparado por sonicação em um sonicador de haste (Q700 da QSonica<sup>®</sup>) com amplitude de 15% em modo descontínuo por 10 minutos com intervalo de 30 segundos a cada 2 minutos (potência 700 watts) e banho de gelo; e a segunda (ME B) também constituída pelos mesmos componentes da formulação anterior, mas desta vez com a adição do Poloxamer 407<sup>®</sup>, um co-polímero cuja função seria aprimorar a bioadesão futuramente testada no ensaio *in vivo*. Após a obtenção da ME base (sem o ativo), as amostras foram incorporadas através de sonicação sob as mesmas condições, mas dessa vez com tempo de sonicação de 3 minutos em modo contínuo (BONIFÁCIO et al., 2015).

#### **4.4.1. Caracterização estrutural das microemulsões**

As MEs foram caracterizadas através da análise do tamanho das partículas (técnica de correlação de fótons) utilizando o equipamento de espalhamento dinâmico de radiação laser – Light Scattering (Zetasizer Nano NS – Malvern Instruments<sup>®</sup>). Trata-se de um equipamento com elevada sensibilidade na determinação de pequenas mudanças no diâmetro médio, que podem acontecer devido às camadas adsorvidas na superfície da partícula ou as pequenas variações no processo de manufatura. Quando um feixe de luz é lançado através de uma dispersão coloidal, as partículas ou gotas são capazes de espalhar a luz em todas as direções, permitindo que flutuações tempo-dependentes na intensidade do espalhamento sejam observadas através de um detector responsável por processar os dados e enviar a um computador. A partir dessa técnica, é possível calcular o raio hidrodinâmico das partículas coloidais da equação de Stokes-Einstein (equação 1):

$$D = KT/6\pi\eta Rh \quad (\text{equação 1})$$

onde, D: coeficiente de difusão das partículas; K: constante de Boltzmann ( $1,3807 \times 10^{-23} \text{ NmK}^{-1}$ ); T: temperatura absoluta (293,15 K);  $\pi$ : 3,141592;  $\eta$ : viscosidade ( $1,002 \times 10^{-3} \text{ NM}^{-2\text{s}}$ ); Rh: raio hidrodinâmico.

A análise das MEs foi realizada em um analisador de gotículas, onde a amostra foi colocada em uma câmara de análise (20 °C) de uma maneira que o feixe de laser (532 nm) atravessasse a dispersão em toda sua extensão. Foram realizadas 10 determinações do diâmetro médio e índice de polidispersidade (IPD) das gotículas de cada amostra (n = 3).

### 4.5. Ensaios de toxicidade

#### 4.5.1. Determinação da citotoxicidade em linhagens celulares

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Micobacteriologia (Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP), em colaboração com a aluna de pós-doutorado Isabel Cristiane da Silva, sob supervisão do Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan. A metodologia foi realizada conforme recomendado por Pavan et al. (2010).

Os ensaios *in vitro* para a determinação da viabilidade celular foram realizados frente às linhagens: VERO [(ATCC CCL-81<sup>TM</sup>) células epiteliais de rim de macaco], MRC-5 [(ATCC CCL-171) linhagem humana de fibroblasto pulmonar] e HaCaT (queratinócitos humanos). Até o momento do uso, as linhagens foram mantidas congeladas (-80 °C) em tubos criogênicos (alíquota) contendo soro fetal bovino (SFB) (Vitrocell<sup>®</sup>) e 5 % de DMSO.

As linhagens foram descongeladas e cultivadas em garrafas com superfície em torno de  $12,50 \text{ cm}^2$  contendo 10 mL de meio DMEM (Vitrocell<sup>®</sup>). O meio foi enriquecido com 10% de soro fetal bovino, sulfato de gentamicina (50 mg/L) e anfotericina B (2 mg/L). As garrafas foram incubadas a 35 °C com 5% de CO<sub>2</sub> até atingir a confluência celular e, após este período, as células foram retiradas através do uso de solução de tripsina/EDTA (Vitrocell<sup>®</sup>), centrifugadas a 2000 rpm durante 5 minutos e, contadas em câmara de Neubauer de maneira a ajustar a concentração para  $1 \times 10^5$  cels/mL. A partir desta suspensão, foram depositados 200  $\mu\text{L}$  em cada orifício da microplaca (96 poços e as microplacas foram incubadas (37 °C) em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> para permitir a aderência celular à microplaca. Após 24 horas de incubação, o meio foi removido e as amostras a serem testadas, previamente diluídas nas

concentrações de 1000 a 3,9 µg/mL, foram adicionadas aos poços da microplacas (100 µL), as quais foram novamente incubadas por mais 24 horas. Após adição do revelador resazurina 0,01% (30 µL) nos poços da microplaca e incubação durante 6 horas, os resultados foram avaliados através da leitura realizada no leitor de microplacas Cytation (Biotek<sup>®</sup>), onde foram utilizados filtros de excitação (530 nm) e emissão (590 nm). O IC<sub>50</sub> foi definido como a maior concentração dos extratos capaz de permitir a viabilidade de pelo menos 50% das células. Como controle, o IC<sub>50</sub> dos solventes utilizados para o extrato livre (DMSO) e incorporado (ME base) também foi determinado em cada ensaio. Como controle de morte celular foi utilizado o fármaco doxorrubicina (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) à concentração inicial de 27,18 µg/ml (50 nmol). Cada ensaio foi realizado em triplicata.

#### 4.5.2. Avaliação da toxicidade aguda frente à *Artemia salina* L. (Artemiidae)

*Artemia salina* L. (Artemiidae), o camarão de água salgada, se trata de um componente invertebrado da fauna dos ecossistemas aquáticos e marinhos salinos que desempenha um papel importante no fluxo de energia da cadeia alimentar e, pode ser utilizado em bioensaio de laboratório para determinar a toxicidade através da CL<sub>50</sub> (PARRA et al., 2001). Segundo Solis et al. a determinação da toxicidade através do CL<sub>50</sub> tem uma grande vantagem, pois é uma metodologia simples e barata para *screening* de compostos, e que pode ser considerado um experimento *in vivo*.

De acordo com Parra et al. (2001) para determinar a toxicidade das amostras em *Artemia salina*, 25 mg de ovos (*Artemia salina* do RN, Natal- Brasil) foram incubados em um béquer (2000 mL) com água salgada artificial a temperatura de 20 a 30 °C. A água salina artificial foi consistida de 23 g NaCl (Qhemis), 11 g MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (Usb Corporation Clevelan, OH USA), 4 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Synth), 1,3 g CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O (Merck), 0,7 g KCl (Merck) em 1000 mL de água destilada. O pH foi ajustado para 9,0 usando NaOH 5N para evitar o risco de morte para a *Artemia larvae* (náuplios) por diminuição do pH durante a incubação.

Após 24 horas, foram adicionados ao béquer 0,6 g de *Saccharomyces cerevisiae* (Dr. Oetker) para cada litro de água salgada, de modo a alimentar os náuplios; 48 horas após os ovos serem incubados, os náuplios foram extraídos para o experimento. Uma suspensão de náuplios (10-15 organismos), 120 µL, foi adicionada a cada poço da microplaca de 96 orifícios, incluindo o grupo controle. Em uma microplaca de 96 orifícios separada, foi realizada a diluição seriada do extrato livre ou incorporado. As concentrações testadas foram

de 500-0,97 µg/mL. Após 24 horas de incubação, a placa foi então examinada sob uma lupa binocular (x3,0) e o número de náuplios vivos em cada poço foi contado e a concentração letal mediana (CL<sub>50</sub>) foi calculada utilizando o método estatístico (SOLIS et al., 1993).

De acordo com a *Food and Drug Administration* (FDA), a CL<sub>50</sub> é definida como a concentração de amostra capaz de ser letal a 50% dos organismos após sua exposição. A CL<sub>50</sub> é geralmente expressa como uma variável tempo-dependente (por exemplo, 24 horas CL<sub>50</sub>). Em todos os ensaios de toxicidade, utilizou-se DMSO a 2% (Sigma Aldrich®) e a ME a 2% como controle.

#### 4.6. Ensaio *in vivo*

O ensaio *in vivo* teve aprovação prévia do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/UNESP (Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 28/2015). O ensaio de candidíase vulvovaginal (CVV) foi realizado de acordo com a metodologia descrita em Ramos (2015), com modificações. Ratas Wistar fêmeas (n = 6) com peso médio entre 150-200 g e 8 semanas de idade permaneceram durante todo o experimento no biotério do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP. As condições ambientais foram devidamente programadas de forma que a temperatura permanecesse adequada e com 12 horas de ciclo claro/escuro e, sem qualquer restrição de alimento e água.

O ensaio foi realizado com diferentes grupos (Tabela 5), os quais foram tratados com: o creme vaginal contendo tetraciclina (25 mg/g) + anfotericina B (12,5 mg/g) (controle positivo de ação antifúngica); DMSO 10 % (controle do solvente do extrato livre); o extrato livre - concentração de 2x o CIM (solubilizado em DMSO 10%); ME A base (controle da ME A sem o extrato); o extrato incorporado na ME A - concentração de 2x o CIM (ME base A com o extrato); ME B base (controle da ME B sem o extrato) e o extrato incorporado na ME B (ME base B com o extrato) - concentração de 2x o CIM. Além disso, foram utilizados animais como controle negativo e positivo de infecção, ou seja, não infectados e infectados e não tratados, respectivamente.

**Tabela 5.** Grupos de experimentação para o ensaio anti-candidíase vulvovaginal (CVV).

| Grupo | Controle ou Tratamento   |
|-------|--|
| 1     | Controle negativo de infecção (não infectados)   |
| 2     | Controle positivo de infecção (infectados e não tratados)                              |
| 3     | Controle positivo antifúngico (infectados e tratados com antifúngico)                  |
| 4     | Controle do solvente do extrato livre (infectados e tratados com DMSO 10% e água 90%)  |
| 5     | Tratamento 1 (infectados e tratados com o extrato livre, ou seja, diluído em DMSO 10%) |
| 6     | Controle da ME A base (infectados e tratados com a ME A base)                          |
| 7     | Tratamento 2 (infectados e tratados com o extrato incorporado na ME A)                 |
| 8     | Controle da ME B base [infectados e tratados com a ME B base (com Poloxamer® 407)]     |
| 9     | Tratamento 3 (infectados e tratados com o extrato incorporado na ME B)                 |

ME: microemulsão

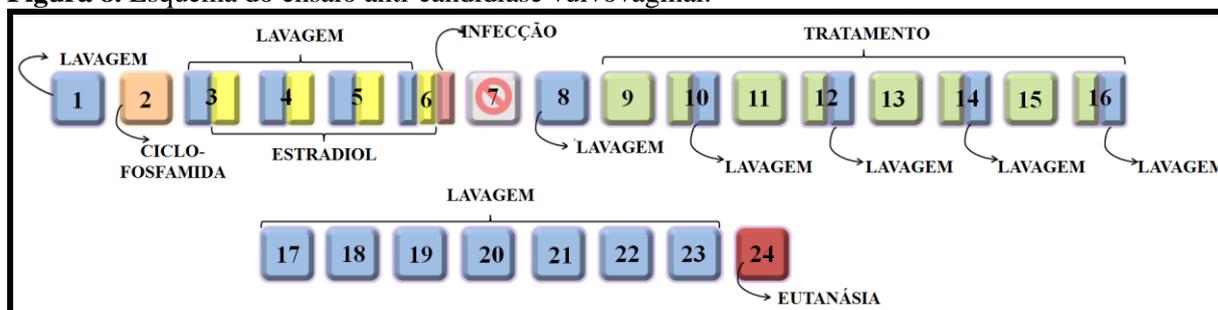
A Figura 8 apresenta o esquema do ensaio anti-CVV. Inicialmente os animais foram imunossuprimidos com a administração intraperitoneal (0,3 mL na concentração de 50 mg/Kg de peso corpóreo – dose única) de ciclofosfamida (CPA). Em seguida, cada animal recebeu, por via subcutânea, a solução de estradiol (0,1 mL na concentração de 0,2 mg/animal). A administração de estradiol foi realizada 1 vez ao dia durante o período necessário para que todos os animais atingissem o estado pseudo-estro (falso-cio), que foi avaliado através da lavagem vaginal com 0,1 mL de PBS estéril. O fluido a fresco foi observado microscopicamente (40x) para que os animais pudessem ser classificados quanto ao ciclo estral.

Após a confirmação da fase pseudo-estro em todos os animais, os mesmos foram infectados com a levedura *C. albicans* SC5314, cuja cultura foi inicialmente cultivada em ASD e após 48 horas padronizada em PBS pH=7,2 estéril. Depois de confirmada a concentração de  $5 \times 10^7$  UFC/mL, realizada através da contagem em câmara de Neubauer, os animais foram infectados através da administração intravaginal de 0,1 mL da suspensão padronizada. Depois de 2 dias (8º dia de experimento), os animais foram submetidos à lavagem vaginal para monitoramento da infecção, no qual o fluido vaginal foi diluído, e posteriormente semeado em ASD contendo cloranfenicol. Após incubação a 37 °C durante 48

horas foi realizada a contagem do número de colônias e o sucesso da infecção foi considerado quando o animal apresentasse UFC/mL superior a 100.

O tratamento iniciou-se logo após a confirmação de que todos os animais estavam realmente infectados, e ocorreu da mesma forma para todos os grupos (2 x por dia, durante 8 dias consecutivos) onde 0,1 mL da amostra foi administrada por via intravaginal. A avaliação do tratamento foi realizada através da lavagem vaginal com 0,1 mL de PBS pH=7,2 estéril, e o fluído semeado em meio ASD + cloranfenicol (37 °C por 48 horas) para realização da contagem de colônias. Após o término do tratamento, os animais passaram por lavagem vaginal diária durante uma semana a fim de verificar a possível recidiva de infecção, sendo no último dia de experimento realizada a eutanásia dos animais.

**Figura 8.** Esquema do ensaio anti-candidíase vulvovaginal.



Fonte: Autora

**Experimentos realizados durante o Doutorado Sanduíche na  
The University of Texas at San Antonio (UTSA), Texas, Estados Unidos**

**4.7. Eficácia contra coleção de cepas e isolados clínicos de *Candida albicans* e *Candida glabrata***

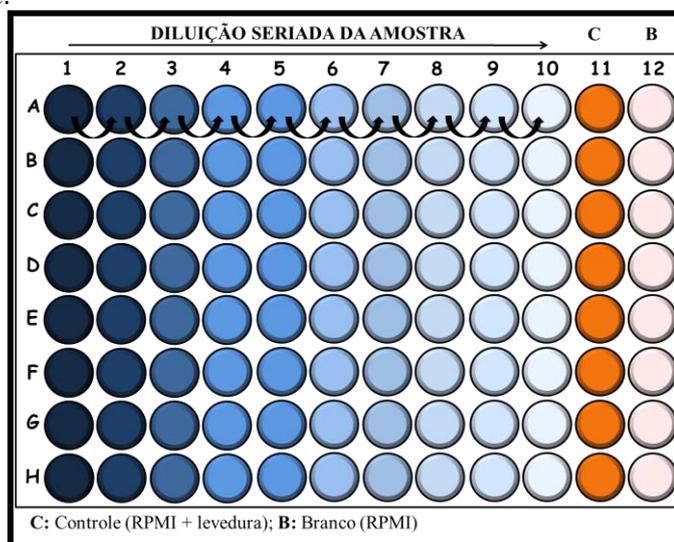
A atividade das amostras foi novamente avaliada contra as cepas *C. albicans* SC5314 e *C. glabrata* ATCC 2001 pertencentes ao laboratório onde foi realizado o doutorado sanduíche (The University of Texas at San Antonio (Texas, Estados Unidos), Department of Biology, Candida's lab sob supervisão do Prof. Dr. José Luis Lopez-Ribot). As amostras também foram avaliadas contra tipos de diversos isolados clínicos de *C. albicans*: uns que apresentam diferentes níveis de resistência aos agentes antifúngicos pertencentes à classe dos azóis e equinocandinas e, outros, com mecanismos moleculares de resistência aos azóis previamente caracterizados (cepas TW2, TW3 e TW17), os quais representam uma série de isolados clínicos sensíveis e resistentes do mesmo paciente com candidíase orofaríngea

(WHITE, 1997). Além disso, foram utilizadas três cepas geneticamente modificadas (ganhadoras de funções) contendo os fatores de transcrição *TAC1*, *MRR1* e *UPC2*, os quais conferem um perfil de resistência aos azóis.

Para *C. glabrata*, as amostras também foram avaliadas frente a uma série de isolados clínicos com diferentes perfis de resistência para fluconazol ou caspofungina (os isolados foram cedidos pelo Fungus Testing Laboratory – UT Health and Sciences Center, San Antonio, Texas, Estados Unidos).

A atividade da amostra vegetal determinada para células planctônicas também utilizou o ensaio de microdiluição como descrito no documento M27-A3 publicado pelo CLSI onde a CIM<sub>90</sub> foi considerada a concentração capaz de inibir 90% do crescimento fúngico. A diluição seriada das amostras (100 µL) foi realizada em meio RPMI 1640 (100 µL) em microplacas de fundo redondo de 96 poços e, a levedura (100 µL) foi adicionada em cada poço (concentração final de 1x10<sup>3</sup> cels/mL) das microplacas, que foram incubadas a 37 °C por 48 horas (Figura 9). Os valores de CIM foram avaliados através de análise visual e confirmados por espectrofotometria a 490 nm em um leitor de microplacas (Benchmark, Bio-Rad®, CA).

**Figura 9.** Design da microplaca para o ensaio de microdiluição frente às células planctônicas de *C. albicans* e *C. glabrata*.



Fonte: Autora

#### 4.8. Atividade contra biofilmes

A atividade da amostra contra biofilmes de *C. albicans* e *C. glabrata* foi avaliada tanto em biofilmes pré-formados como também em sua capacidade em inibir sua formação. O

experimento foi realizado de acordo com um protocolo originalmente desenvolvido no laboratório do Dr. Lopez-Ribot (PIERCE et al., 2008).

**Atividade contra biofilmes pré-formados:** inicialmente, 100 µL do inóculo foram adicionados em cada poço de uma microplaca de 96 poços com fundo chato (concentração final de  $1 \times 10^6$  cels/mL), a qual foi incubada a 37 °C por 24 horas. Após este período, o líquido foi cuidadosamente removido para não tocar o biofilme já formado, o qual foi lavado duas vezes com PBS (100 µL) de maneira a remover as células planctônicas não aderentes. Em uma outra microplaca, as amostras foram diluídas (1000 - 1,95 µg/mL) e transferidas para a microplaca contendo o biofilme pré-formado, a qual foi incubada por mais 24 horas a 37 °C.

**Inibição contra biofilme:** o meio de cultura RPMI 1640 (50 µL) foi adicionado em cada poço de uma microplaca de 96 poços com fundo chato e, as amostras (50 µL) foram adicionadas na coluna 1 e diluídas até a coluna 10 (1000 - 1,95 µg/mL). Então, 50 µL da suspensão de levedura (concentração de  $2 \times 10^6$  cels/mL) foram adicionados das colunas 1 a 10 e as microplacas foram incubadas por 24 horas a 37 °C.

Após este período, o líquido de cada poço das microplacas dos dois ensaios foi cuidadosamente removido e o biofilme foi lavado duas vezes com PBS (100 µL) para remover as células planctônicas e não aderentes. Os resultados avaliados através da medida da atividade metabólica após o tratamento antifúngico foi feito através da redução do 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida (XTT), no qual 100 µL da solução de XTT contendo 0,01 % de menadiona foram adicionados em cada poço das microplacas, as quais foram cobertas com papel alumínio e incubadas no escuro por 2 horas a 37 °C. Os valores de CIM foram avaliados através da análise visual, tipicamente apresentando um gradiente de coloração alaranjada e, após a transferência de 90 µL do sobrenadante da microplaca original para uma nova, que foi lida através da leitura espectrofotométrica (490 nm) em um leitor de microplacas (Benchmark, Bio-Rad®, CA).

#### **4.9. Estudos de combinação com os fármacos antifúngicos convencionalmente utilizados**

A atividade *in vitro* das amostras em combinação com fluconazol, anfotericina B e caspofungina, como representantes de cada classe de antifúngicos, foi avaliada através do ensaio *checkerboard* de acordo com a metodologia descrita no CLSI e LaFayette et al (2010).

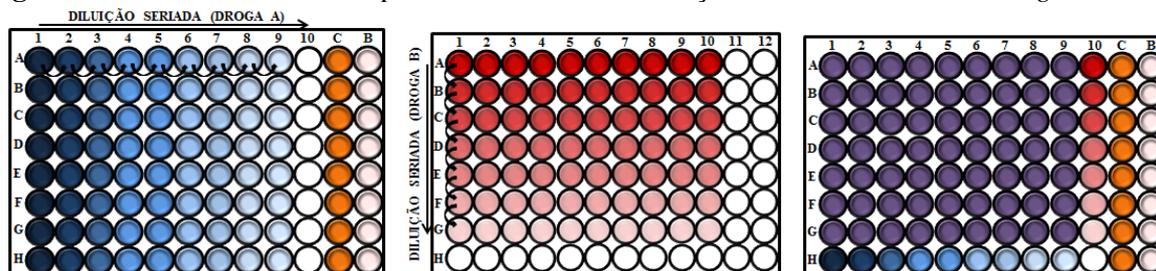
Em uma microplaca de 96 poços com fundo redondo foram adicionados 50 µL do meio de cultura RPMI em todos os poços das colunas 2 a 10 (linhas A-H). Então, foram

adicionados 100 µL da amostra A na coluna 1 inteira e, realizada a diluição seriada (50 µL) da coluna 1 a 9. Em uma segunda microplaca, foram adicionados 50 µL de RPMI em todos os poços das linhas B a H e, 100 µL da amostra B foram adicionados na linha A (coluna 1 a 10), a qual foi diluída seriadamente da linha A a G. As concentrações da amostra B foram transferidas para os respectivos poços da microplaca contendo a amostra A. Dessa maneira, a linha H (colunas 1-9) e coluna 10 (linhas A-G) representam as amostras A e B sozinhas, respectivamente. A levedura (100 µL) foi adicionada em todos os poços das colunas de 1 a 11 (concentração final de  $1 \times 10^3$  cels/mL) e, então, as microplacas foram incubadas a 37 °C por 48 horas (Figura 10). As colunas 11 e 12 representam os controles de crescimento e meio. Os valores de CIM foram avaliados pela análise visual e confirmada por espectrofotometria (490 nm) em um leitor de microplacas (Benchmark, Bio-Rad®, CA).

Os resultados foram analisados de acordo com o índice da concentração inibitória fracionada (ICIF), como definido pela equação 2:  $ICIF = (CIF_A + CIF_B)$ , onde:  $CIF_A = (CIM_{A\text{ combinado}}/CIM_{A\text{ sozinho}})$  e  $CIF_B = (CIM_{B\text{ combinado}}/CIM_{B\text{ sozinho}})$ .  $CIM_{A\text{ sozinho}}$  e  $CIM_{B\text{ sozinho}}$  são os valores de CIM das amostras A e B e,  $CIM_{A\text{ combinado}}$  e  $CIM_{B\text{ combinado}}$  são as concentrações das amostras A e B nas combinações, respectivamente. Os valores de CIM foram considerados como a menor concentração testada na microdiluição e, ICIF foi interpretado como sinergismo ( $ICIF \leq 0,5$ ), indiferença ( $ICIF > 0,5 - 4,0$ ) e antagonismo ( $ICIF > 4,0$ ) (HINDLER, 1995).

$$ICIF = \frac{CIM_A \text{ combinado}}{CIM_A \text{ sozinho}} + \frac{CIM_B \text{ combinado}}{CIM_B \text{ sozinho}} \quad (\text{equação 2})$$

**Figura 10.** Ensaio *checkerboard* para amostras em combinação frente a *C. albicans* e *C. glabrata*.



1. Crescer as cepas de *Candida* em meio YPD a 30 °C com agitação
2. Preparar o inóculo em RPMI em uma concentração de células de  $1 \times 10^3$
3. Adicionar RPMI (50 µL) das colunas 2 a 10 (linhas A-H)
4. Adicionar a droga A (100 µL) na coluna 1 (linhas A-H) e diluir da coluna 1 a 9
5. Em outra microplaca, adicionar RPMI (50 µL) da linha B a H (colunas 1 a 10)
6. Adicionar a droga B (100 µL) na linha A (coluna 1-10) e diluir da linha A a G
7. Transferir a droga B para a microplaca contendo a droga A, começando da linha H (menor concentração)

**Fonte:** Autora

### 4.10. Experimento de passagem seriada para avaliar o potencial para o desenvolvimento de resistência

O experimento de passagem seriada, utilizado para avaliar o possível desenvolvimento de resistência das cepas por meio de exposições diárias da amostra vegetal, foi baseado em estudos anteriores realizados para avaliar a resistência aos azóis (COWEN et al., 2002). As cepas *C. albicans* SC5314 e *C. glabrata* ATCC 2001 foram individualmente expostas a concentrações sub inibitórias da amostra vegetal (metade da CIM<sub>50</sub>) ou fluconazol. Inicialmente, as culturas foram cultivadas *overnight* em meio *yeast extract peptone dextrose* (YPD) e colocadas em *shakers* orbitais a 37 °C. Então, 10 µL de cada cultura foram transferidos diariamente para um tubo com 1 mL de YPD contendo a amostra. As transferências diárias foram realizadas durante o período de 8 semanas e após a primeira semana, as cepas foram expostas ao CIM<sub>50</sub> das amostras e, esta concentração foi mantida até o final do experimento. Além das transferências diárias, as amostras provenientes das culturas também eram armazenadas em meio YPD contendo 40% de glicerol a -80 °C. Os estoques foram utilizados para a determinação do CIM das amostras, que foram avaliadas semanalmente.

### 4.11. Eficácia do extrato contra cepas de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*

A atividade antifúngica determinada para as células planctônicas de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* também foi realizada através do ensaio de microdiluição em microplacas conforme descrito no documento M27-A3 publicado pelo CLSI. Foi seguido o mesmo procedimento utilizado para o ensaio contra as cepas de *Candida* sp. (item 4.7), com algumas modificações, sendo que para estas cepas, as microplacas foram incubadas a 30 °C. A leitura final foi realizada após 72 horas de incubação. OBS

### 4.12. Espectro de ação contra múltiplas espécies fúngicas

Esses experimentos foram realizados em colaboração com o *Fungus Testing Laboratory* localizado em San Antonio, Texas, que é considerado o principal laboratório de referência nos Estados Unidos. A amostra foi testada contra espécies de *Candida* não-*albicans*, incluindo *C. parapsilosis*, *C. krusei*, e *C. glabrata* além de, *C. neoformans*, *Rhizopus arrhizus*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium* sp, e *Scedosporium* sp. Todos os isolados

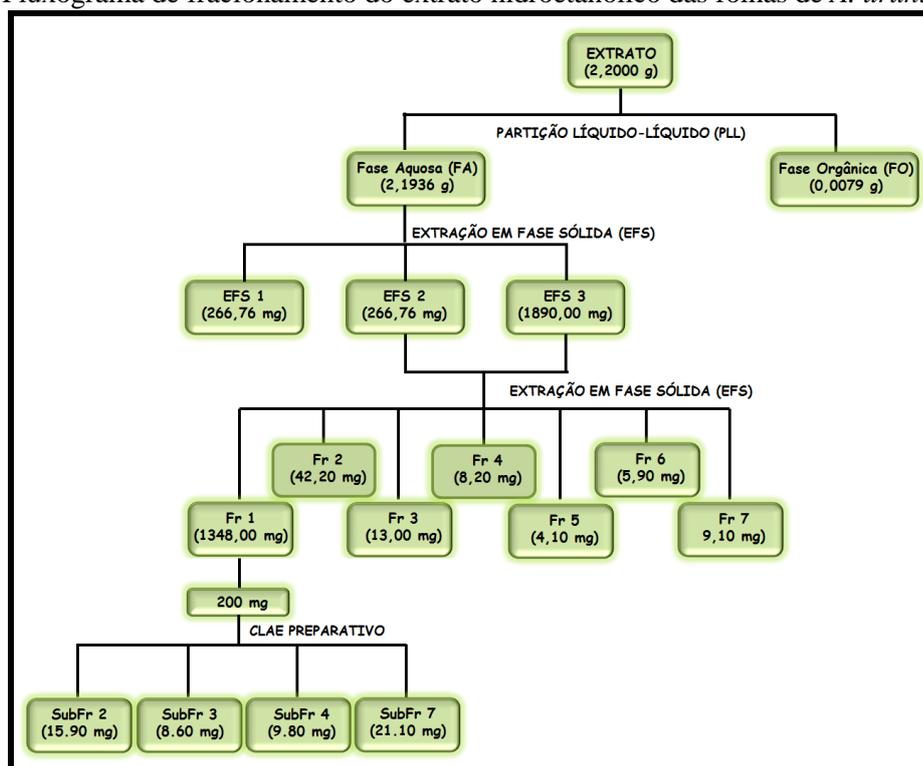
clínicos fúngicos testados fazem parte da coleção disponível no *Fungus Testing Laboratory* na the University of Texas Health Science Center em San Antonio. Os valores de CIM foram determinados de acordo com a norma M27-A3 (para leveduras) e M38-A2 (para fungos filamentosos) do CLSI.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise por CCD após PLL

O fracionamento do extrato por PLL resultou em 2 fases: FA (etanol:água, 40:60, v/v) e FO (hexano), as quais foram submetidas aos ensaios de atividade antifúngica. Os rendimentos do fracionamento estão apresentados no fluxograma presente na Figura 11.

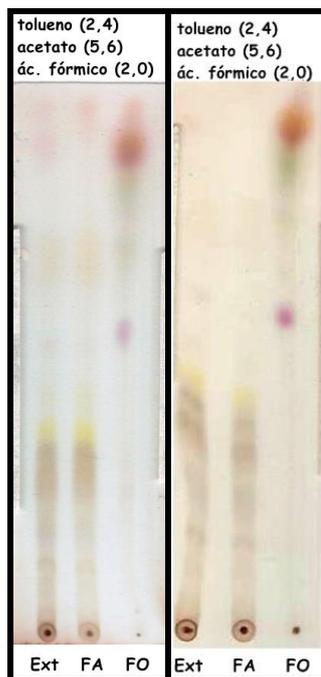
Figura 11. Fluxograma de fracionamento do extrato hidroetanólico das folhas de *A. urunudeva*.



Fonte: Autora.

Após a triagem realizada na CCD com diversos solventes em diferentes proporções (Tabela 3), foi empregada FM constituída de tolueno/acetato de etila/ácido fórmico (2,4:5,6:2,0, v/v/v, 30 mL), a qual proporcionou a melhor resolução entre os componentes e passou a ser utilizada nas etapas posteriores. A Figura 12 mostra as cromatoplasmas do extrato, FA e FO após a revelação com anisaldeído sulfúrico 10 % na menor e maior escala, respectivamente.

**Figura 12.** Cromatoplacas do extrato (Ext), fase aquosa (FA) e fase orgânica (FO) na menor e maior escala, respectivamente.



Fonte: Autora.

Após analisar a cromatoplaça do extrato, FA e FO podem-se observar diferentes componentes na FO em relação ao extrato e FA. Isso é extremamente interessante, pois demonstra que a PLL funcionou como uma etapa prévia para eliminação de substâncias lipofílicas, ou seja, de possíveis interferentes apolares que poderiam ficar retidos na sílica C<sub>18</sub>. Caso algum desses componentes apolares fosse o responsável pela atividade antifúngica poderia não ser possível detectar sua ação, já que haveria a possibilidade de ficar retido na FE, que também é apolar. Após a remoção dos interferentes apolares, criou-se uma condição ideal para fracionar a fase mais ativa através da EFS.

Após serem submetidos aos ensaios microbiológicos, a FA foi selecionada como sendo a fase mais ativa e esta foi então submetida a um novo fracionamento, desta vez por EFS. Os resultados de atividade antifúngica estão apresentados mais detalhadamente na Tabela 6.

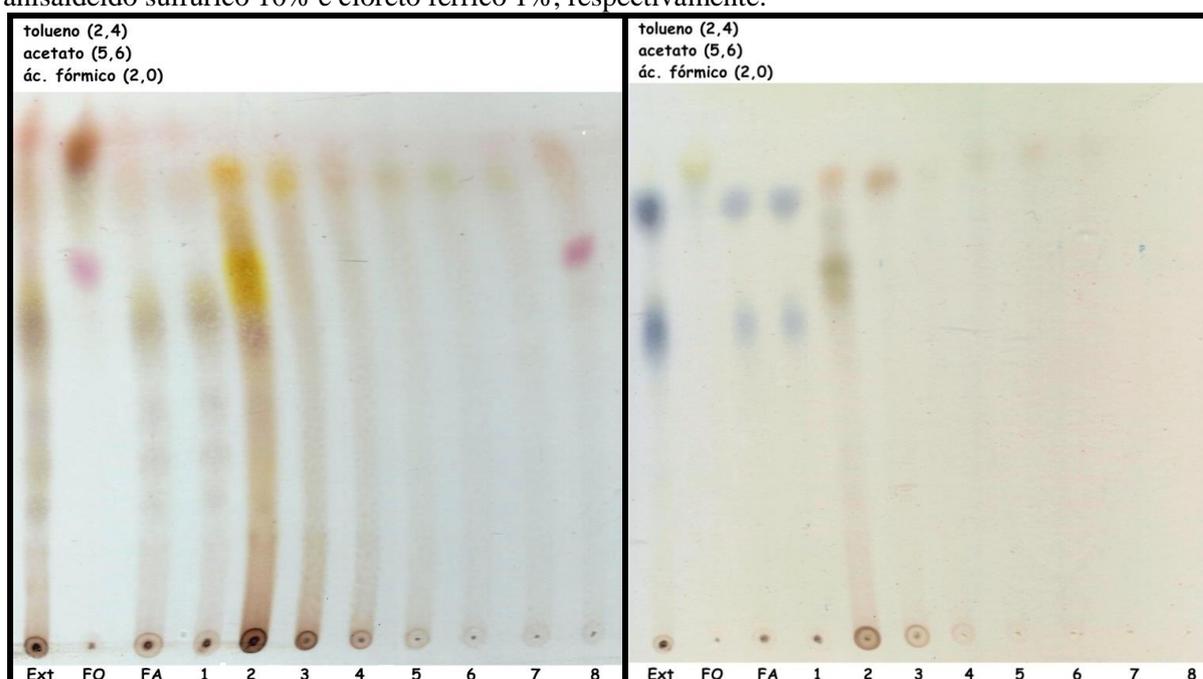
### 5.2. Análise por CCD após Extração em Fase Sólida

A EFS é uma técnica adequada para fracionamento inicial de amostras complexas, com o objetivo de separá-las em poucas frações, ainda complexas, mas de composição química distinta.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as FMs testadas a que produziu melhor resolução cromatográfica foi tolueno/acetato de etila/ácido fórmico (2,4:5,6:2,0, v/v/v). Após o fracionamento na FA por EFS, pode-se observar na Figura 13 que, após a revelação com anisaldeído sulfúrico, as frações 5, 6, 7 apresentaram única mancha na cromatoplaça com valor de  $R_f$  próximo de 0,8. Além desta mancha, a fração 3 apresentou outra adicional com menor valor de  $R_f$ . A fração 8 (eluída com metanol) apresentou um perfil cromatográfico semelhante à FO, demonstrando que ainda restou um resíduo dos componentes de FA em FO. A fração 2 apresentou manchas com valores de  $R_f$  entre 0,5 e 0,8 com maior intensidade. A fração 1 apresentou 7 manchas todas correspondentes às manchas verificadas para FA. Isto demonstra que a fração 1 concentrou os componentes majoritários de FA. A mancha de maior intensidade nestas amostras apresentou valor de  $R_f$  de cerca de 0,6. A revelação com cloreto férrico demonstrou a presença de duas manchas principais com coloração azul no extrato, FA e fração 1, ausentes nas demais amostras, o que inicialmente sugere a presença de taninos hidrolisáveis ou substâncias relacionadas nas mesmas. Com o objetivo de obter uma melhor separação na EFS, foi realizada a EFS 2 com alteração no gradiente de metanol: água, as placas também foram eluídas com tolueno/acetato de etila/ácido fórmico (2,4:5,6:2,0, v/v/v) e reveladas com anisaldeído sulfúrico 10% e cloreto férrico 1%.

**Figura 13.** Cromatoplaças do extrato, FO, FA e frações obtidas da EFS 1, após revelação com anisaldeído sulfúrico 10% e cloreto férrico 1%, respectivamente.



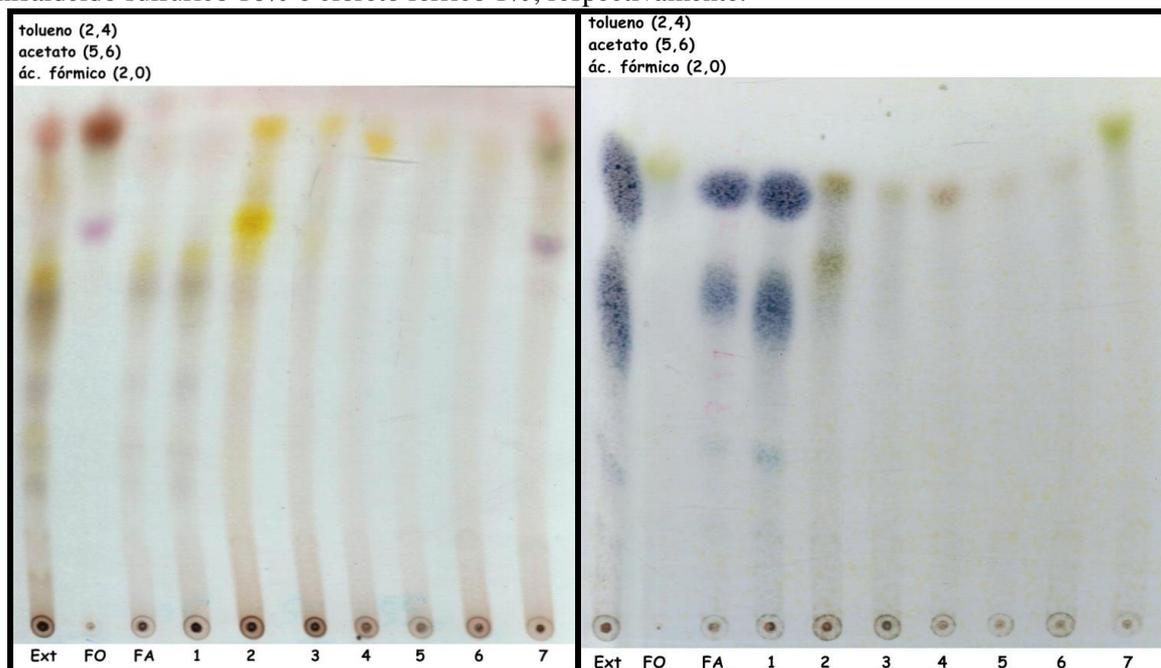
Fonte: Autora.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após revelação das placas com anisaldeído sulfúrico 10% (revelador universal) e cloreto férrico é possível observar que houve uma melhor separação cromatográfica na EFS 2 especialmente com relação às frações 1, 2 e 3 (Figura 14). A utilização da sílica C<sub>18</sub> como fase estacionária - FE (cadeia carbônica grande) garantiu que os componentes mais apolares ficassem mais retidos, permitindo primeiramente a eluição dos mais polares. Em todas as etapas, o extrato foi juntamente analisado com a FO, FA e frações obtidas, a fim de garantir a comparação dos componentes eluídos com os demais obtidos a partir do fracionamento.

O cloreto férrico trata-se de um revelador seletivo que permite a visualização de compostos fenólicos presentes nas amostras. Manchas de coloração azul são características de taninos hidrolisáveis, enquanto que manchas verdes podem indicar tanto a presença de taninos condensados quanto de outros polifenóis. Após a revelação das placas com este revelador (Figura 14), foram detectadas manchas de coloração azul no extrato, FA e fração 1, sugerindo a presença de taninos hidrolisáveis, ácido gálico ou ainda de derivados do ácido gálico. Na fração 2, não é possível observar a presença de manchas azuis, sendo que as de coloração verde podem estar relacionadas à presença de flavonoides. O mesmo não pode ser observado no restante das frações analisadas, pela dificuldade de se observar a presença de algum componente. A CCD em sílica gel é uma das técnicas mais utilizadas para separação e identificação de produtos naturais (VALENTE et al., 2006).

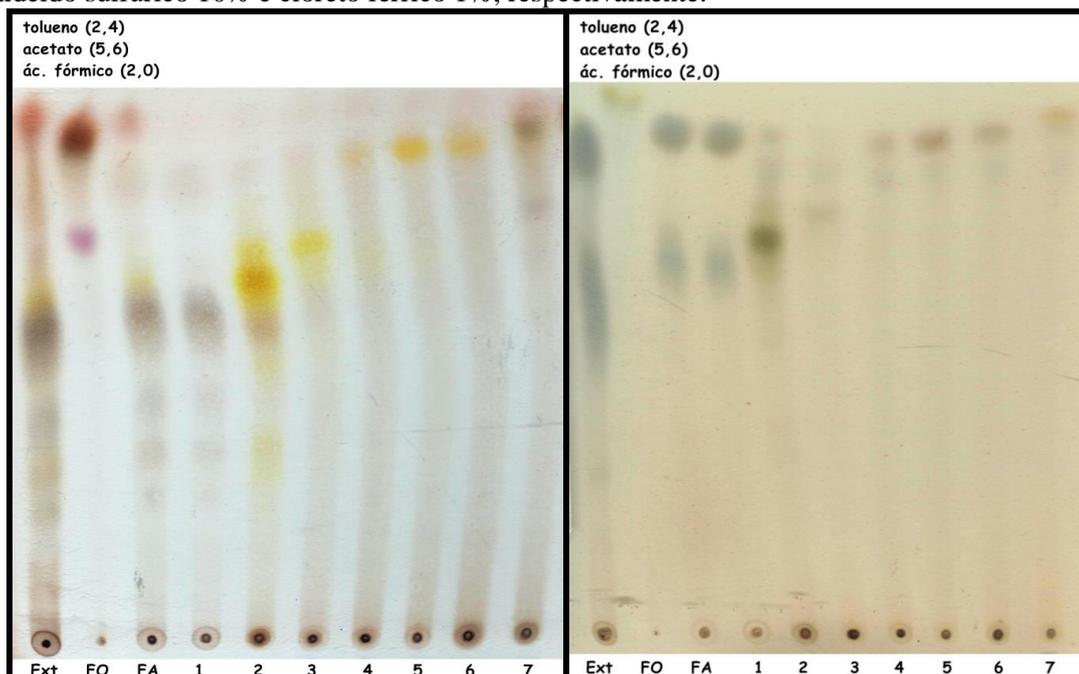
**Figura 14.** Cromatoplasmas do extrato, FO, FA e frações obtidas da EFS 2, após revelação com anisaldeído sulfúrico 10% e cloreto férrico 1%, respectivamente.



Fonte: Autora.

Depois de estabelecida a melhor condição cromatográfica na EFS 2, foi realizada a EFS em maior escala (EFS 3), e as frações foram novamente analisadas por CCD (Figura 15) a fim de confirmar o perfil de separação obtido na EFS 2.

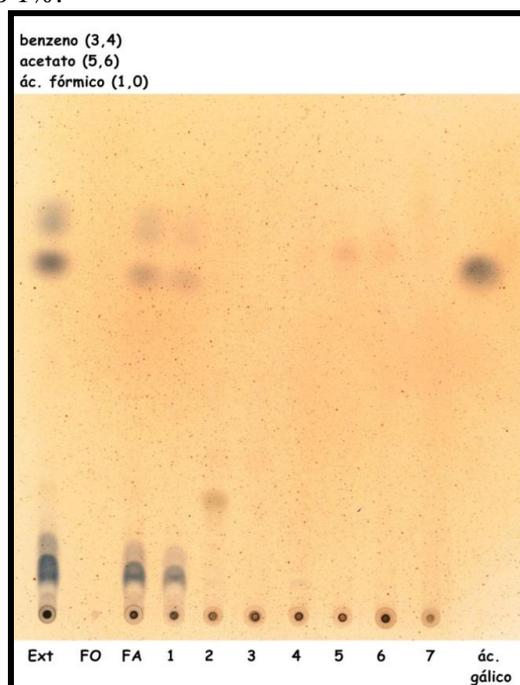
**Figura 15.** Cromatoplasas do extrato, FO, FA e frações obtidas da EFS 3, após revelação com anisaldeído sulfúrico 10% e cloreto férrico 1%, respectivamente.



Fonte: Autora.

Após a observação desses resultados, decidiu-se realizar mais uma análise por CCD, desta vez aplicando-se também o padrão de ácido gálico a fim de se comparar seu valor de Rf com as demais frações, bem como sua coloração adquirida (Figura 16).

**Figura 16.** Cromatoplaça do extrato, FO, FA, frações obtidas da EFS 3 e padrão de ácido gálico após revelação com cloreto férrico 1%.



Fonte: Autora.

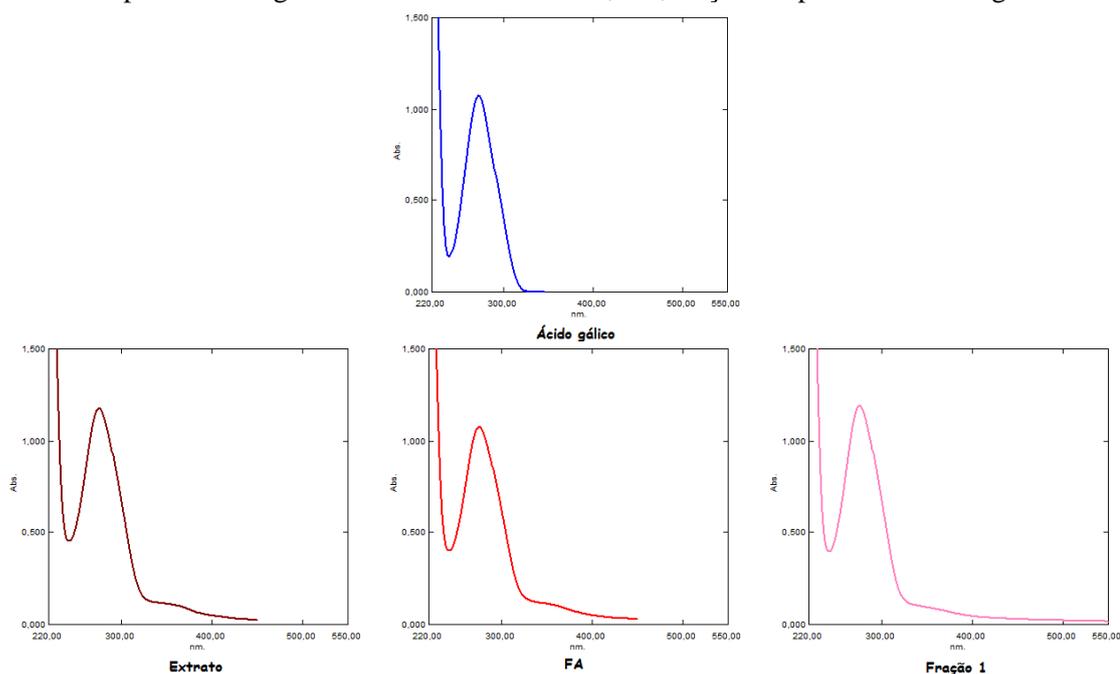
Pode-se confirmar que dentre todas as frações, a mancha correspondente ao padrão de ácido gálico é encontrada somente na fração 1, além do extrato e FA. Com relação ao rendimento das EFS, a fração 1 representou cerca de 94% da massa aplicada de FA.

### 5.3. Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta

Ao analisar os espectros na região do UV, pode-se observar os resultados abaixo, lembrando que além das amostras vegetais (extrato, FO, FA e todas as frações obtidas), o ácido gálico também foi analisado:

- o extrato, a FA e fração 1 e o ácido gálico apresentaram espectros bem semelhantes com máximos de absorção em torno de 272 nm (Figura 17), sugerindo a presença de taninos hidrolisáveis, ácido gálico ou outros derivados do ácido gálico.

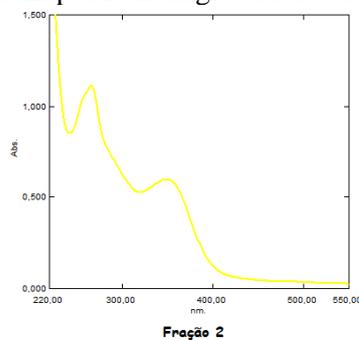
**Figura 17.** Espectros na região do UV do extrato bruto, FA, fração 1 e padrão de ácido gálico.



Fonte: Autora

- a fração 2 sugere a presença de flavonoides ao apresentar bandas em torno de 280 e 350 (Figura 18);

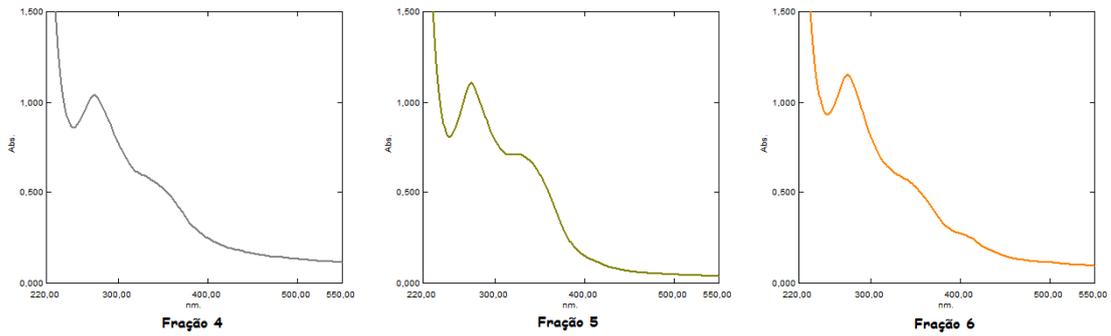
**Figura 18.** Espectro na região do UV da fração 2.



Fonte: Autora

- os espectros das frações 4, 5 e 6 (Figura 19) estão praticamente sobrepostos um ao outro, indicando que tais frações apresentam os mesmos componentes, possivelmente flavonoides ao apresentar máximos entre 240-285 nm e 300-400. Essas frações foram reunidas para posteriormente serem avaliadas na determinação da atividade antifúngica;

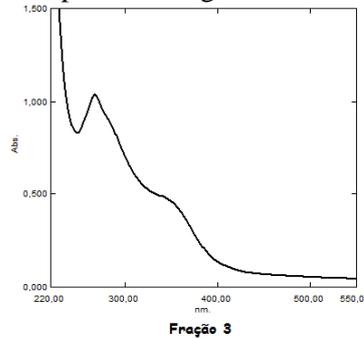
**Figura 19.** Espectros na região do UV das frações 4, 5 e 6.



Fonte: Autora

- apesar da semelhança, o espectro da fração 3 (Figura 20) não está tão sobreposto ao das frações 4, 5 e 6;

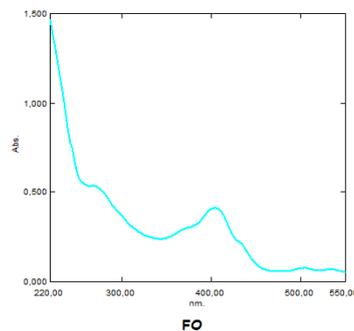
**Figura 20.** Espectro na região do UV da fração 3.



Fonte: Autora

- na FO (Figura 21) os picos em 400 e 700 são característicos de clorofila, enquanto que em 268 nm sugere a presença de algum composto fenólico ou terpenos.

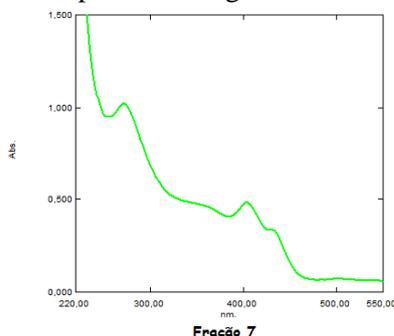
**Figura 21.** Espectro na região do UV da FO.



Fonte: Autora

- assim como a FO, a fração 7 (Figura 22) também sugere a presença de clorofila, provavelmente devido à algum resíduo da FO;

**Figura 22.** Espectro na região do UV da fração 7.



Fonte: Autora

Diante desses espectros, pode-se destacar que os resultados provenientes da análise no UV são coerentes com aqueles obtidos da CCD, o que é extremamente interessante, pois se trata de duas técnicas completamente diferentes que foram capazes de mostrar resultados compatíveis. Além disso, pode-se inferir que uma boa separação foi alcançada, pois a maioria das frações encontram-se diferentes entre si. Destacam-se os resultados obtidos da fração 1, pois tanto a análise da CCD quanto do UV sugerem a forte presença de ácido gálico, que apresenta grande atividade antibacteriana segundo um estudo encontrado na literatura (DAGLIA, 2012). Além disso, a fração 1 foi a que apresentou maior rendimento, cerca de 94%, facilitando os estudos posteriores.

#### **5.4. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato, fases e frações frente cepas padrão e isolados clínicos de *C. albicans* e *C. glabrata***

Os valores de CIM do extrato, FO, FA e frações obtidas da EFS 2+3 estão apresentados na Tabela 6.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Tabela 6.** Valores de CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) das amostras vegetais através da revelação com TTC (2%).

| Amostra        | Cepa<br>ATCC 10231 | <i>C. albicans</i><br>CAV3 | <i>C. albicans</i><br>SC5314 | <i>C. glabrata</i><br>ATCC 2001 | <i>C. glabrata</i><br>CGV 3 |
|----------------|--------------------|----------------------------|------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| Extrato        | 15,62              | 62,5                       | 31,25                        | 0,24                            | 62,5                        |
| FO             | > 1000             | > 1000                     | > 1000                       | 250                             | > 1000                      |
| FA             | 15,62              | 62,5                       | 31,25                        | 0,24                            | 62,5                        |
| Fração 1       | 15,62              | 62,5                       | 31,25                        | 0,24                            | 62,5                        |
| Fração 2       | 125                | > 1000                     | > 1000                       | 7,81                            | 62,5                        |
| Fração 3       | 125                | 250                        | 250                          | 7,81                            | 125                         |
| Fração 456     | 125                | 125                        | 250                          | 15,62                           | 125                         |
| Fração 7       | 125                | 125                        | 250                          | 31,25                           | 125                         |
| Ácido gálico   | > 1000             | > 1000                     | > 1000                       | >1000                           | > 1000                      |
| Anfotericina B | 0,12               | 0,12                       | 1,25                         | 0,25                            | 1,00                        |
| Fluconazol     | -                  | -                          | -                            | -                               | -                           |

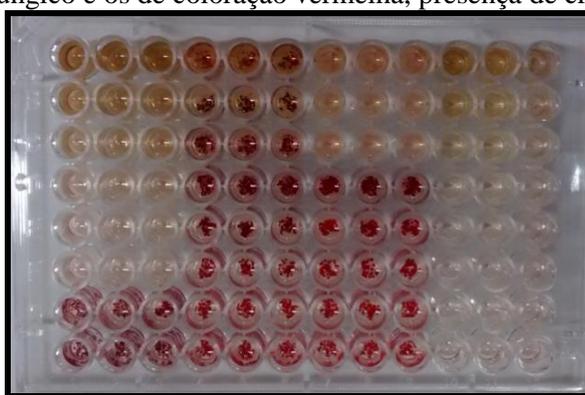
- resistente; FO: fase orgânica; FA: fase aquosa

Os resultados apresentados na Tabela 6 mostraram que todas as amostras vegetais até então testadas haviam apresentado atividade antifúngica frente a todas as cepas testadas, incluindo cepas padrão e clínicas, com exceção da FO que apresentou atividade apenas para *C. glabrata* ATCC 2001 com um CIM de 250  $\mu\text{g/mL}$ . Pode-se observar que tanto o extrato, quanto a FA e a fração 1 apresentaram os mesmos valores de CIM para todas as cepas fúngicas, indicando que a melhor atividade antifúngica é dada pela presença de algum componente presente na fração 1. Destacam-se os resultados obtidos frente a *C. glabrata* ATCC 2001 com um CIM de 0,24  $\mu\text{g/mL}$ , o que parece ser bastante interessante uma vez que apresentou um valor de CIM praticamente igual ao da anfotericina B.

Apesar disso, não se pode descartar os resultados obtidos das demais frações, que apresentaram valores de CIM significativos perante as cepas fúngicas testadas, incluindo até

mesmo os isolados clínicos que apresentam um maior grau de resistência. É possível observar que frente aos isolados clínicos, estas frações apresentaram valores de CIM maiores, ou seja, menor atividade antifúngica. Diante dos resultados microbiológicos, a fração 1 foi então selecionada para dar continuidade aos estudos na investigação das substâncias responsáveis pela atividade antifúngica. A Figura 23 mostra representativamente um ensaio revelado com TTC 2%.

**Figura 23.** Microplaca após revelação com TTC (2%), na qual os poços incolores apresentam ausência de crescimento fúngico e os de coloração vermelha, presença de crescimento fúngico.



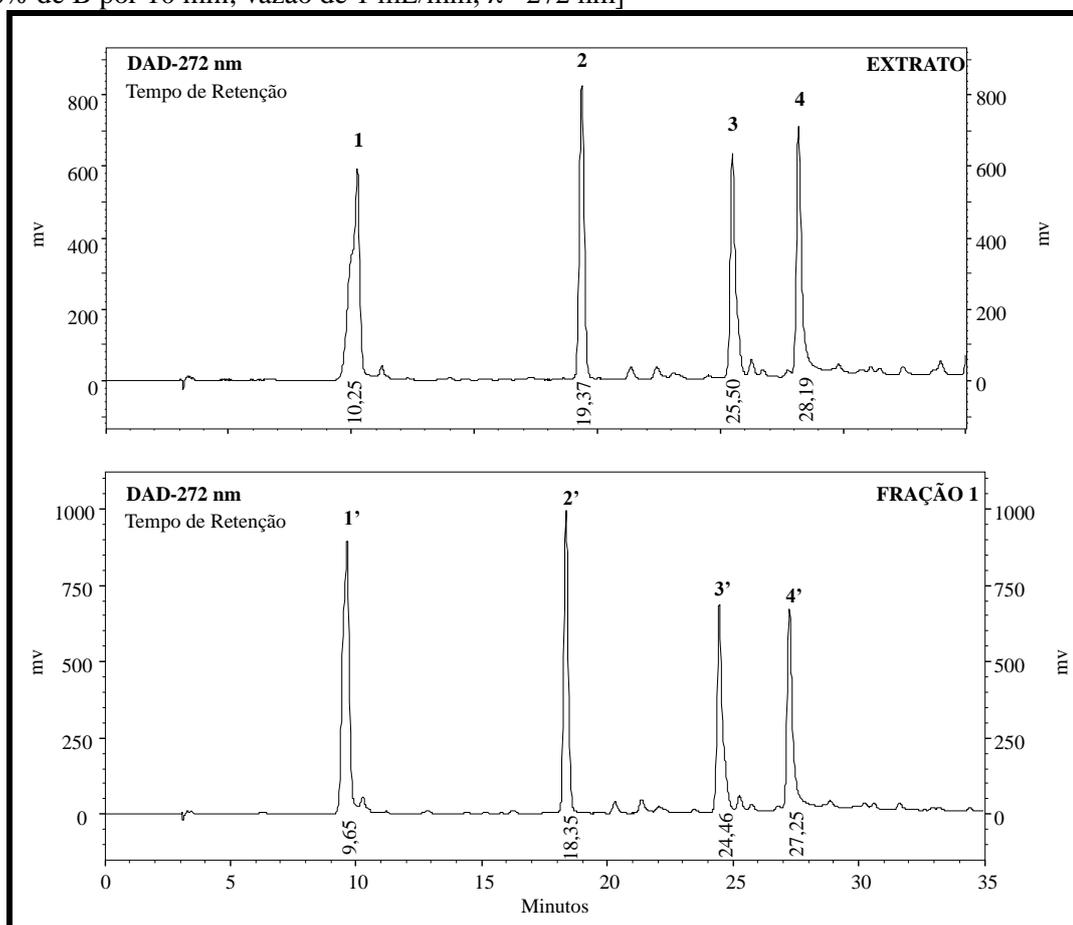
Fonte: Autora.

### 5.5. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – DAD do extrato e da fração 1

Uma vez que a fração 1 obtida a partir da EFS foi a que apresentou espectro na região do UV mais semelhante aos espectros do extrato, FA e ácido gálico, além dos melhores resultados microbiológicos, tal fração foi submetida à análise por CLAE-DAD.

A avaliação dos perfis cromatográficos (Figura 24) obtidos mostrou grande semelhança entre o extrato e a fração 1 ( $t_R$  e áreas dos picos), apresentando quatro picos majoritários ( $t_R$  dos picos do extrato): 1 ( $t_R = 10,25$  min), 2 ( $t_R = 19,37$  min), 3 ( $t_R = 25,50$  min) e 4 ( $t_R = 28,19$  min). É importante destacar que tanto o extrato quanto a fração 1 foram preparadas na mesma concentração (5 mg/mL) e injetados no mesmo volume (20  $\mu$ L). Apenas o pico 2 apresentou área um pouco maior na fração 1.

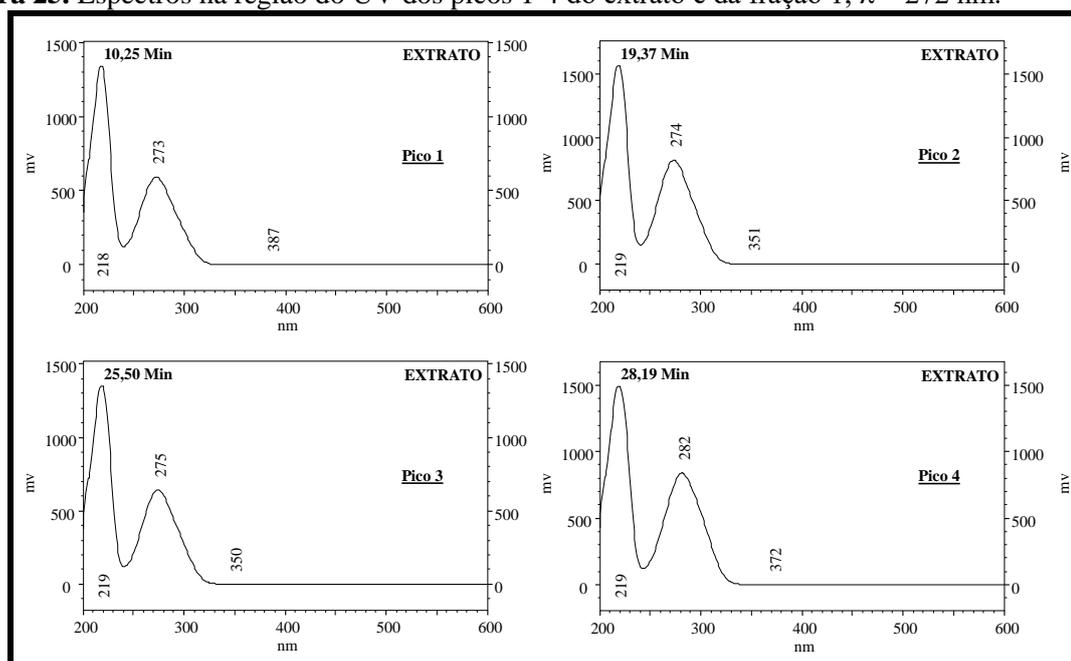
**Figura 24.** Cromatograma representando o perfil do extrato e da fração 1 [Coluna Analítica Phenomenex® Luna C<sub>18</sub>, 250 x 4,60 mm de diâmetro interno; Solvente A: H<sub>2</sub>O + 0,01% TFA; Solvente B: metanol + 0,01% TFA. Gradiente de 5-50% de B por 30 min, de 50-100% de B por 5 min e 100% de B por 10 min; vazão de 1 mL/min;  $\lambda = 272$  nm]



Fonte: Autora.

Os espectros na região do UV obtidos para o extrato (Figura 25) mostram duas bandas distintas com máximos de absorções igualmente observadas nos espectros da fração 1. Os picos de 1-4 do extrato e fração 1 exibiram duas bandas, uma com  $\lambda_{\max}$  na faixa de 218-219 nm e uma segunda banda com  $\lambda_{\max}$  na faixa de 273-282 nm. Diante desses resultados, pode-se inferir que tais compostos fazem parte de uma mesma classe de metabólitos, podendo possuir os mesmos grupos cromóforos e consequentemente perfis bastante similares no espectro de UV.

**Figura 25.** Espectros na região do UV dos picos 1-4 do extrato e da fração 1;  $\lambda = 272$  nm.



Fonte: Autora

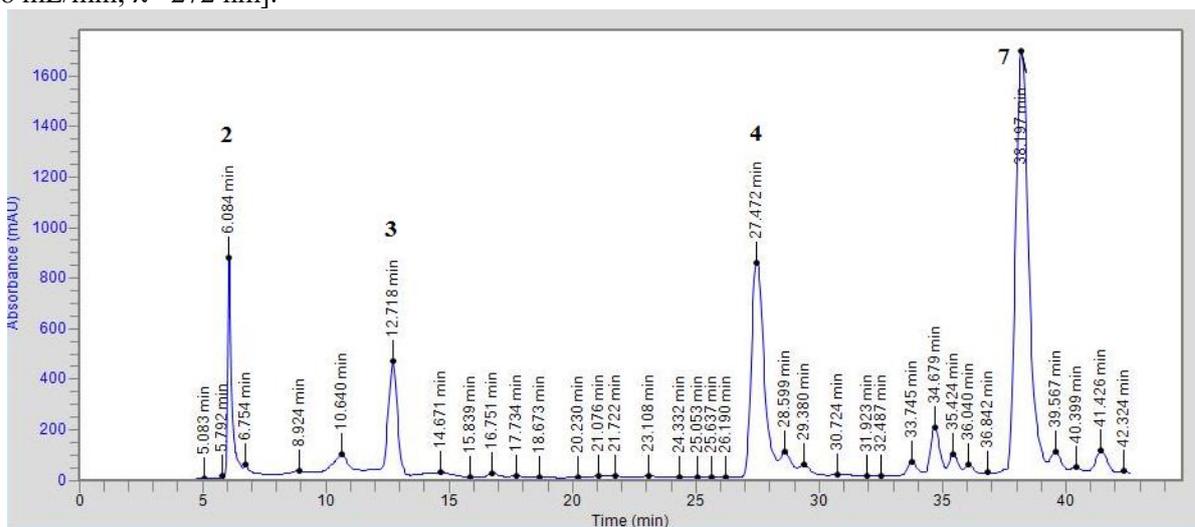
A possível presença de taninos hidrolisáveis ou derivados do ácido gálico pode ser evidenciada através das bandas de absorção com máximos em 210-220 nm e entre 260-280 nm. Os dados obtidos por CLAE-DAD estavam de acordo com os obtidos por CCD e espectrofotometria no UV sugerindo a presença de taninos hidrolisáveis, ácido gálico ou seus derivados como componentes majoritários do extrato e da fração 1.

Em 2011, Silva et al. avaliaram a composição do extrato hidroetanólico das folhas de *A. urundeuva* utilizando espectrometria de massas com ionização por *electrospray* e, as análises preliminares mostraram a presença de derivados de ácido gálico e galotaninos. Como metabólitos secundários, os taninos são considerados compostos fenólicos com variado peso molecular e complexidade. Exceto os de elevado peso molecular, os taninos são altamente solúveis em água e são capazes de se ligar às proteínas formando complexos insolúveis. Além disso, podem ser classificados como taninos condensados ou taninos hidrolisáveis. Os taninos hidrolisáveis são constituídos de ésteres do ácido gálico com açúcares, como a glicose, e unidos por ligações éster-carboxila, o que os torna facilmente hidrolisáveis em meio ácido ou básico (CASTAÑEDA et al., 2012; GOEL; MAKKAR, 2012).

**5.6. Isolamento de substâncias a partir da fração 1 com o emprego de CLAE preparativo de fase reversa**

O isolamento das substâncias presentes na fração 1 resultou em 4 possíveis subfrações (Figura 26), cujos rendimentos estão apresentados na Tabela 7 e Figura 11 (página 55).

**Figura 26.** Cromatograma da fração 1 obtida em CLAE-UV no modo preparativo [Coluna Zorbax® Eclipse XDB C<sub>18</sub>, 250 x 21,20 mm, 7 µm; Gradiente de 15-60% de metanol:água por 60 min; vazão de 8 mL/min; λ= 272 nm].



Fonte: Autora

**Tabela 7.** Massa e rendimento das subfrações obtidas da fração 1.

| Subfração | Massa (mg) | % da Fração 1 | % de Pureza |
|-----------|------------|---------------|-------------|
| 2         | 15,9       | 8,0           | 90,8        |
| 3         | 8,6        | 4,3           | 92,6        |
| 4         | 9,8        | 4,9           | 94,8        |
| 7         | 21,1       | 10,6          | 74,5        |

Após a tentativa de isolamento das substâncias, as subfrações obtidas da fração 1 foram analisadas por CLAE nas mesmas condições anteriormente utilizadas para modo analítico (C<sub>18</sub> 250 x 4,6 mm; 5 µm; 0,4 mL/min; 272 nm; 3 mg/mL; 20 µL). O cálculo da pureza foi realizado com base na porcentagem da área dos picos de interesse em relação à somatória das áreas de todos os picos encontrados no cromatograma (100%). Conforme observado na Tabela 7, as subfrações 2 (90,8%), 3 (92,6%) e 4 (94,8%) encontram-se provavelmente mais puras em relação à subfração 7 (74,5%). Diante disso, os cromatogramas

apresentados pelas substâncias sugerem que elas estão semipurificadas ou em misturas com componente majoritário, principalmente a subfração 7.

### 5.7. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das subfrações da fração 1

Os valores de CIM das subfrações obtidas da fração 1 estão apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8.** Valores de CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) das subfrações através da revelação com TTC (2%).

| Amostra        | Cepa                             |                            |                              |                                 |                             |
|----------------|----------------------------------|----------------------------|------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
|                | <i>C. albicans</i><br>ATCC 10231 | <i>C. albicans</i><br>CAV3 | <i>C. albicans</i><br>SC5314 | <i>C. glabrata</i><br>ATCC 2001 | <i>C. glabrata</i><br>CGV 3 |
| Extrato        | 15,62                            | 62,5                       | 31,25                        | 0,24                            | 62,5                        |
| Fração 1       | 15,62                            | 62,5                       | 31,25                        | 0,24                            | 62,5                        |
| 2              | > 1000                           | > 1000                     | > 1000                       | 250                             | > 1000                      |
| 3              | > 1000                           | > 1000                     | > 1000                       | 31,25                           | > 1000                      |
| 4              | > 1000                           | > 1000                     | > 1000                       | 7,81                            | 500                         |
| 7              | 15,62                            | 62,5                       | 31,25                        | 0,24                            | 62,5                        |
| Anfotericina B | 0,12                             | 0,12                       | 1,25                         | 0,25                            | 1,00                        |
| Fluconazol     | -                                | -                          | -                            | -                               | -                           |

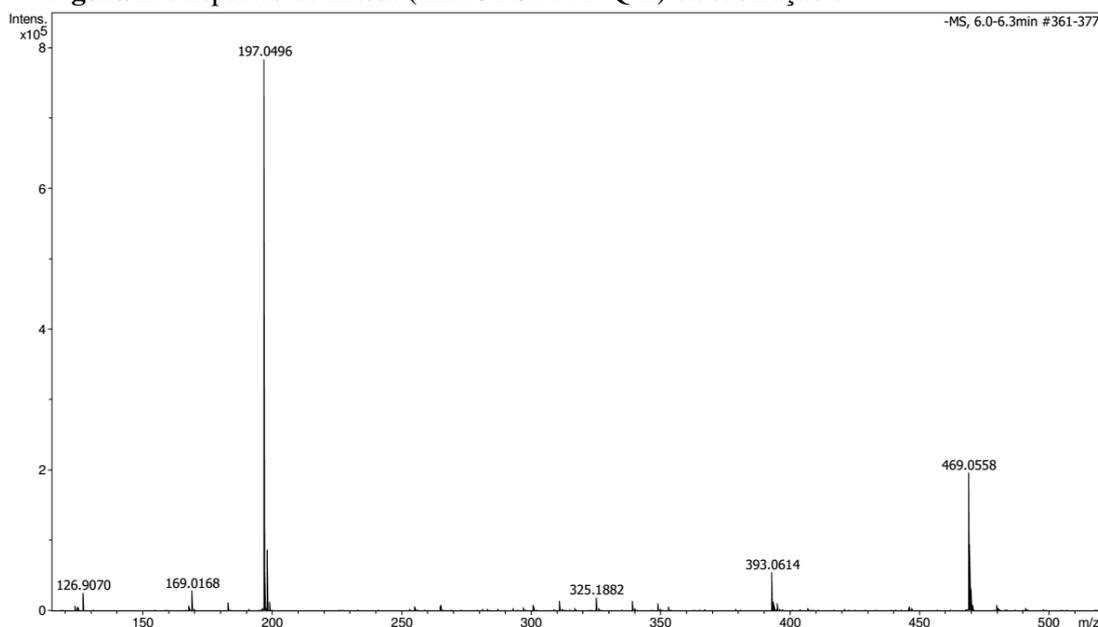
Os resultados apresentados na tabela acima mostram que as subfrações 2, 3 e 4 não apresentaram atividade antifúngica frente às cepas padrão e clínica de *C. albicans* (CIM maior que 1000  $\mu\text{g/mL}$ ). Para a cepa clínica da espécie *C. glabrata*, as subfrações 2 e 3 também não apresentaram atividade antifúngica, enquanto que a subfração 4 apresentou um CIM de 500  $\mu\text{g/mL}$ . Para a cepa padrão desta espécie, as subfrações 2, 3 e 4 apresentaram atividade antifúngica, com valores de CIM de 250; 31,25 e 7,81  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente. Destacam-se os resultados apresentados pela subfração 7, onde se podem observar valores de CIM idênticos para todas as cepas fúngicas aos apresentados pela fração 1 e do extrato, indicando provavelmente que o componente majoritário galato de etila presente na subfração 7 é responsável pela atividade antifúngica do extrato.

5.8. Determinação estrutural da subfração 7

5.8.1. Espectrometria de massa da subfração 7

O espectro de massas da subfração 7 obtido em modo negativo está apresentado na Figura 27.

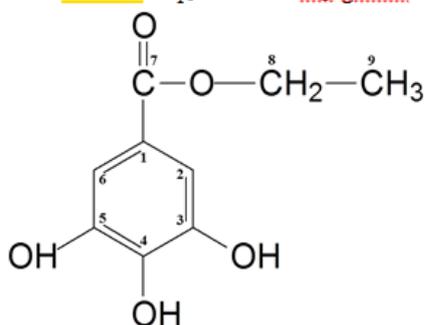
Figura 27. Espectro de massa (micrOTOFTM- Q II) da subfração 7.



Fonte: Autora

O espectro apresentou pico intenso relativo ao íon com  $m/z$  197,0496  $[M-H]^-$ , que corresponde à fórmula molecular  $C_9H_9O_5$ . Além disso, os picos de  $m/z$  169,0168 e 125,9070 possivelmente correspondem às perdas de unidades de  $m/z$  de 29  $[M-CH_2CH_3]$  e 73  $[M-CH_2CH_3CO_2]$ . Tais informações são coerentes com a proposta de identificação do galato de etila ( $C_9H_{10}O_5$ ) (Figura 28) com massa molecular teórica de 198,0528. A diferença entre os valores da massa molecular para  $[M-H]^-$  teórico e obtido (23 ppm) pode estar relacionado a problemas de calibração do equipamento.

Figura 28. Estrutura química do galato de etila.



Fonte: Autora

### 5.8.2. Ressonância Magnética Nuclear de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da subfração 7

Os dados espectrométricos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da subfração 7 estão apresentados na Tabela 9.

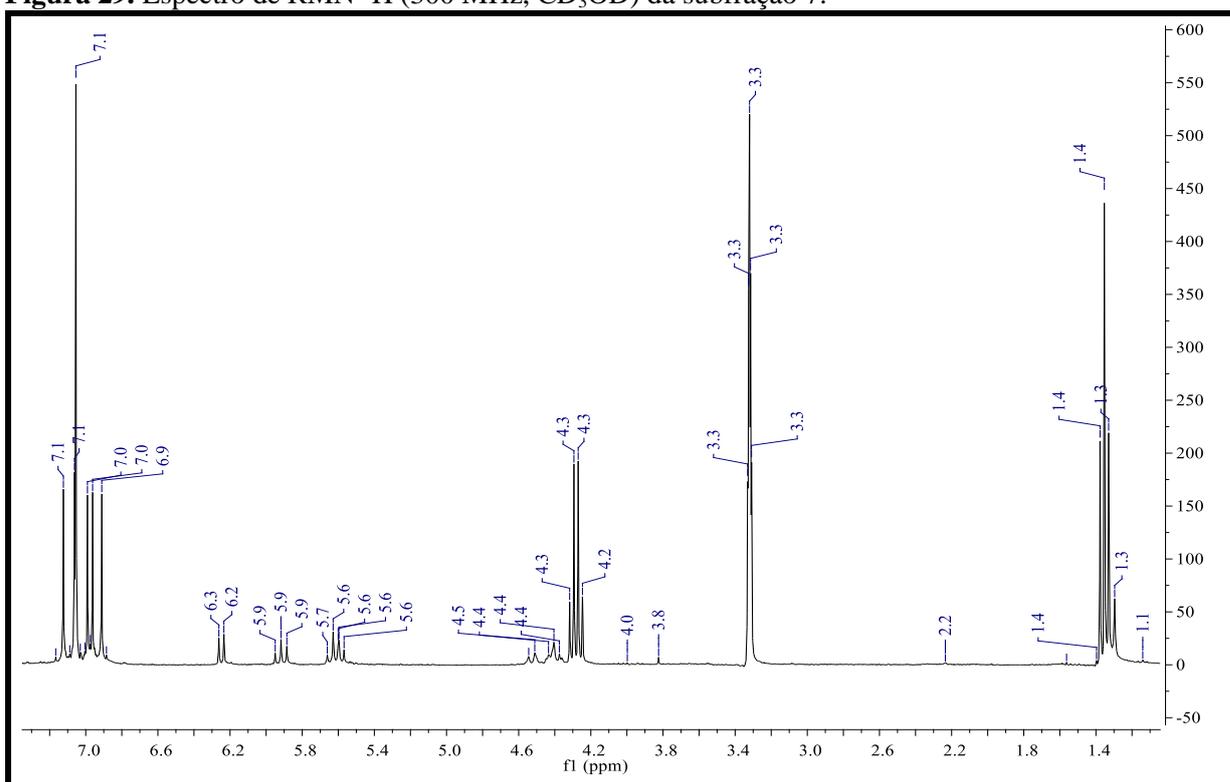
Tabela 9. Dados espectrométricos de RMN obtidos para a subfração 7 a 300 MHz para  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

| C | $^{13}\text{C}^*$ | $^1\text{H} J(\text{Hz})^*$ | $^{13}\text{C}$ | $^1\text{H} J(\text{Hz})$ |
|---|-------------------|-----------------------------|-----------------|---------------------------|
| 1 | 121,70            | -                           | 121,2           | -                         |
| 2 | 110,03            | 7,04 s                      | 109,9           | 7,05 s                    |
| 3 | 146,49            | -                           | 146,4           | -                         |
| 4 | 139,77            | -                           | 139,6           | -                         |
| 5 | 146,49            | -                           | 146,4           | -                         |
| 6 | 110,03            | 7,04 s                      | 109,9           | 7,05 s                    |
| 7 | 168,57            | -                           | 167,2           | -                         |
| 8 | 61,64             | 4,26 q                      | 60,3            | 4,27 q                    |
| 9 | 14,62             | 1,33 t                      | 13,2            | 1,34 t                    |

\*Dados de RMN do galato de etila obtidos em  $\text{CD}_3\text{OD}$  à 600 e 150,8 MHz para  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( OOSHIRO et al., 2009).

A subfração 7 do extrato apresentou em seu espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 29) os sinais característicos do galato de etila; os sinais observados na região de frequência próxima a 7 ppm indicam a presença do anel aromático, enquanto que os apresentados na região de aproximadamente 4,27 e 1,34 indicaram a presença dos radicais etila e metila, respectivamente. O quinteto apresentado na região de 3,3 ppm representa o sinal característico do solvente utilizado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ). No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  além dos sinais referentes ao galato de etila outros sinais relativos a uma ou mais substâncias também foram observados mostrando que esta substância ainda encontra-se em mistura.

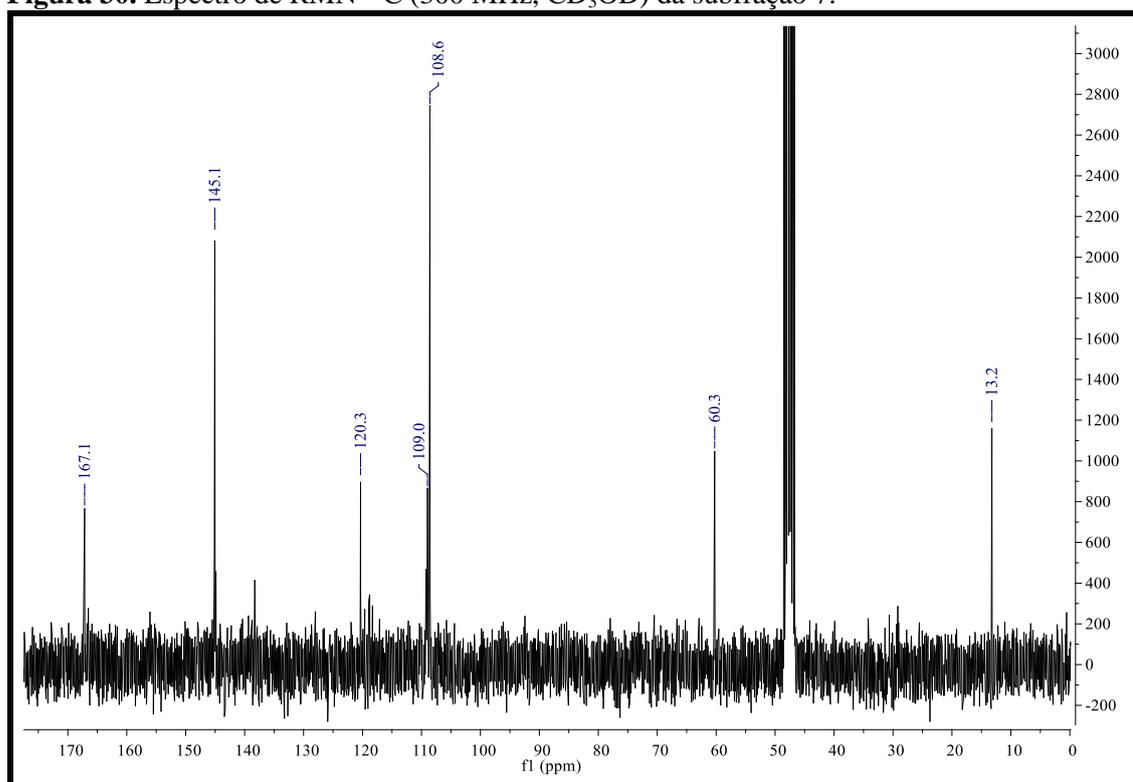
Figura 29. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da subfração 7.



Fonte: Autora

A análise dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 30) também apresentou sinais característicos do galato de etila; os encontramos na região entre 109,9 e 146,4 ppm representam os carbonos que formam o anel aromático, o sinal presente em 167,2 ppm corresponde ao carbono quaternário ligado ao anel aromático, e os sinais em 60,3 e 13,2 representam os carbonos que formam o estearato de etila. O sinal encontrado na região de aproximadamente 47,5 ppm corresponde ao solvente utilizado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ). Assim como no espectro de  $^1\text{H}$ , no espectro de  $^{13}\text{C}$  é possível também observar outros picos, porém em ambos os casos os dados apontam que a substância majoritária na mistura é o galato de etila. As substâncias presentes na fração 1 estão sendo novamente isoladas com objetivo de identificar os demais componentes do extrato presentes junto ao galato de etila na subfração 7, além de identificar os componentes que constituem as demais subfrações (2, 3 e 4).

Figura 30. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da subfração 7.



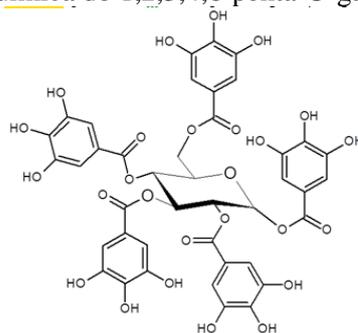
Fonte: Autora

### 5.9. Identificação das demais substâncias majoritárias do extrato

Diante dos resultados microbiológicos apresentados na Tabela 8, nos quais foram analisados o extrato bruto, frações e subfrações obtidas a partir deste, a subfração 7 foi identificada como a mais ativa uma vez que apresentou os mesmos valores de concentração inibitória mínima (CIM) do extrato bruto para as espécies *C. albicans* e *C. glabrata*.

Entretanto, conforme observado nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (Figuras 29 e 30), além dos sinais referentes ao galato de etila, outros foram observados mostrando que esta subfração ainda encontra-se semipurificada. Na busca por identificar esta substância X presente junto ao galato de etila, foram encontrados alguns estudos na literatura (CARVALHO, 2013; SOUZA, 2012; KHANBABAEI; LÖTZERICH, 1997) que relatam sinais para o 1,2,3,4,6-penta-*O*-galoil- $\beta$ -D-glicose (PGG) que são muito semelhantes aos sinais não atribuídos no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da subfração 7 (Figura 31 e Tabela 10).

**Figura 31.** Estrutura química do 1,2,3,4,6-penta-O-galoil- $\beta$ -D-glicose (PGG).



Fonte: Autora

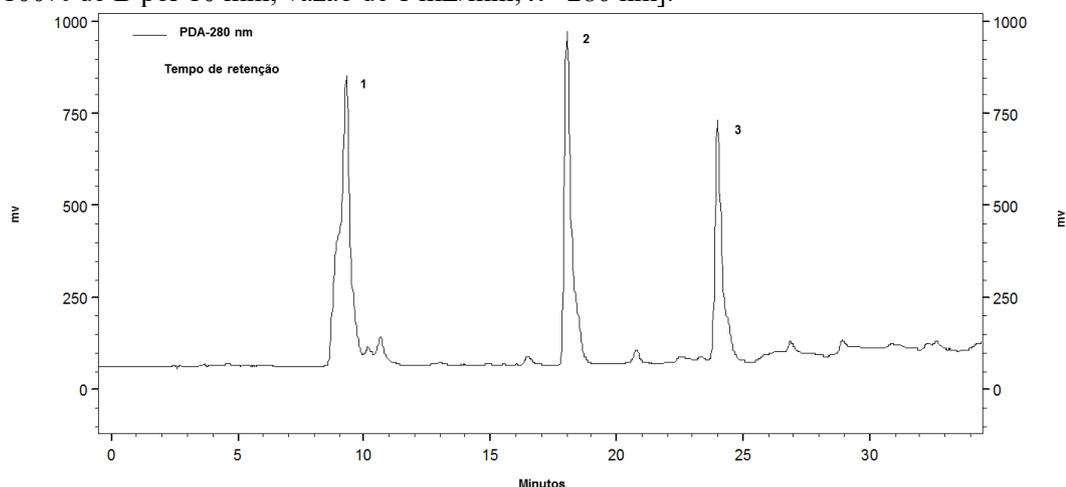
**Tabela 10.** Valores de RMN de  $^1\text{H}$  da substância X ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ), de acordo com Carvalho (2013).

| Hidrogênio | PGG (J, Hz)   | Substância X  |
|------------|---|---|
| 1          | 6,32 <i>d</i> (8,3)   | 6,24 <i>d</i> (8,3)   |
| 2          | 5,62 <i>dd</i> (8,3; 9,7)   | 5,60 <i>dd</i> (8,3; 9,7)   |
| 3          | 6,01 <i>t</i> (9,7)   | 5,63 <i>t</i> (9,7)   |
| 4          | 5,68 <i>t</i> (9,7)   | 5,92 <i>t</i> (9,7)   |
| 5          | 4,55 <i>m</i>   | 4,40 <i>m</i>   |
| 6          | 4,58 <i>dd</i> (2,0; 13,0)  | 4,52 <i>dl</i> (10,0)   |
|            | 4,30 <i>dd</i> (5,3; 13,0)  | 4,40 <i>m</i>   |
| Galoil     | 6,94 <i>s</i> ; 6,97 <i>s</i> ; 7,01 <i>s</i> ; 7,04 <i>s</i> ; 7,10 <i>s</i> | 7,12 <i>s</i> ; 7,06 <i>s</i> ; 6,99 <i>s</i> ; 6,96 <i>s</i> ; 6,91 <i>s</i> |

Com o objetivo de obter uma maior massa das subfrações obtidas para confirmação de algumas análises microbiológicas, o extrato foi novamente analisado por CLAE no modo analítico para posteriormente ser submetido a fracionamento por CLAE preparativa. Entretanto, foram novamente observadas algumas mudanças em seu perfil cromatográfico em relação à análise inicial (Figuras 24).

Quando novamente analisado (Figura 32) e comparado ao seu perfil inicial (Figura 24) pode-se observar a presença dos picos **1** a **3** em tempos de retenção ( $t_R$ ) bem próximos ao cromatograma inicial do extrato, enquanto que o pico **4**, aproximadamente em 28 min, encontra-se praticamente ausente. Uma possível explicação seria a degradação desta substância, provavelmente identificada como o PGG que, quando degradada poderia formar ácido gálico e/ou galato de metila, através do processo de metanólise, uma vez que foi utilizado metanol durante várias etapas do fracionamento.

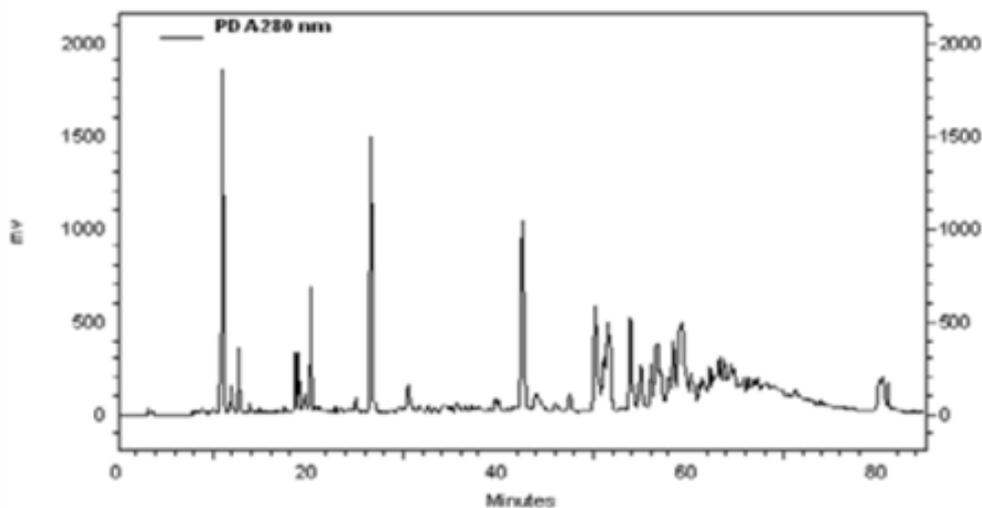
**Figura 32.** Cromatograma do extrato (*clean up* com MeOH) obtido em CLAE-DAD no modo analítico [Coluna Phenomenex® Synergi Hydro C<sub>18</sub>, 250 x 4,6 mm, 4 μm; Solvente A: H<sub>2</sub>O + 0,01% TFA; Solvente B: metanol + 0,01% TFA. Gradiente de 5-50% de B por 30 min, de 50-100% de B por 5 min e 100% de B por 10 min; vazão de 1 mL/min; λ= 280 nm].



Fonte: Autora

Estudos cromatográficos realizados por Souza (2012) haviam mostrado que o perfil cromatográfico deste extrato (Figura 33) apresentava picos bem resolvidos até 45 min e outros mais alargados e sobrepostos entre 45 e 85 min, os quais são característicos de galotaninos. As condições cromatográficas utilizadas foram: FM composta de ACN + TFA 0,1% (B) e H<sub>2</sub>O + TFA 0,1% (A), fluxo de 1 mL/min, λ= 280 nm. Sistema de eluição gradiente: 0-15% B (15 min), 15-20% B (30 min), 20-30% B (30 min), 30-100% B (5 min), 100% B (isocrático, 5 min). Além disso, também foram identificadas as seguintes substâncias no extrato: ácido gálico, galato de metila, galato de etila, ácido protocatecuico, ácido clorogênico, ácido elágico, 1,2,3,4,6-penta-O-galoil-β-D-glicose (PGG), Quercetina-3-O-Rhamnopiranosídeo e a mistura de ácido 3-galoilgálico e 4-galoilgálico.

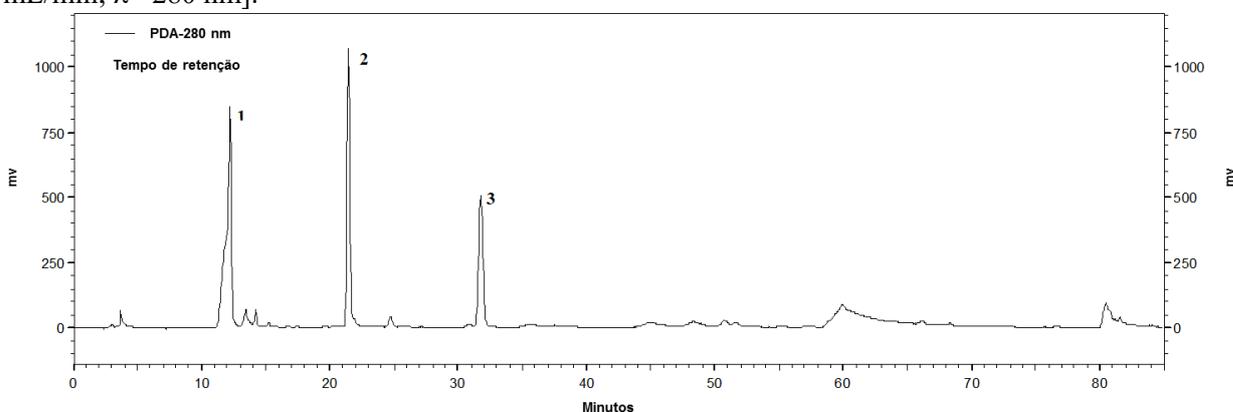
**Figura 33.** Cromatograma do extrato obtido em CLAE-DAD no modo analítico [Coluna Phenomenex® Synergi Hydro C<sub>18</sub>, 250 x 4,6 mm, 4 µm; Gradiente de 0-15% de ACN (15 min), 15-20% ACN (30 min), 20-30% ACN 30-100% (5 min), 100% ACN (5 min); vazão de 1 mL/min; λ= 280 nm].



**Fonte:** Souza (2012).

Quando o extrato foi novamente analisado nesta mesma condição realizada por Souza (2012), pode-se também observar o desaparecimento dos picos sobrepostos entre os tempos de 45 e 85 min (Figura 34), indicando novamente uma possível degradação dos galotaninos. É importante destacar que o extrato foi avaliado nas mesmas condições de análise, coluna e equipamento para que tal comparação fosse realizada. Durante suas análises de purificação realizadas em 2009, Souza (2012) também havia observado que uma possível degradação estaria ocorrendo no extrato, uma vez que passou a não observar algumas ligações depsídicas entre unidades de ácido gálico que haviam sido observadas em análises iniciais do extrato. Embora as condições de armazenamento do extrato sejam apropriadas, pode-se verificar em nosso estudo que o processo de degradação do extrato continua ocorrendo.

**Figura 34.** Cromatograma do extrato obtido em CLAE-DAD no modo analítico [Coluna Phenomenex® Synergi Hydro C<sub>18</sub>, 250 x 4,6 mm, 4 µm; Gradiente de 0-15% de ACN (15 min), 15-20% ACN (30 min), 20-30% ACN (30 min), 30-100% (5 min), 100% ACN (5 min); vazão de 1 mL/min; λ= 280 nm].

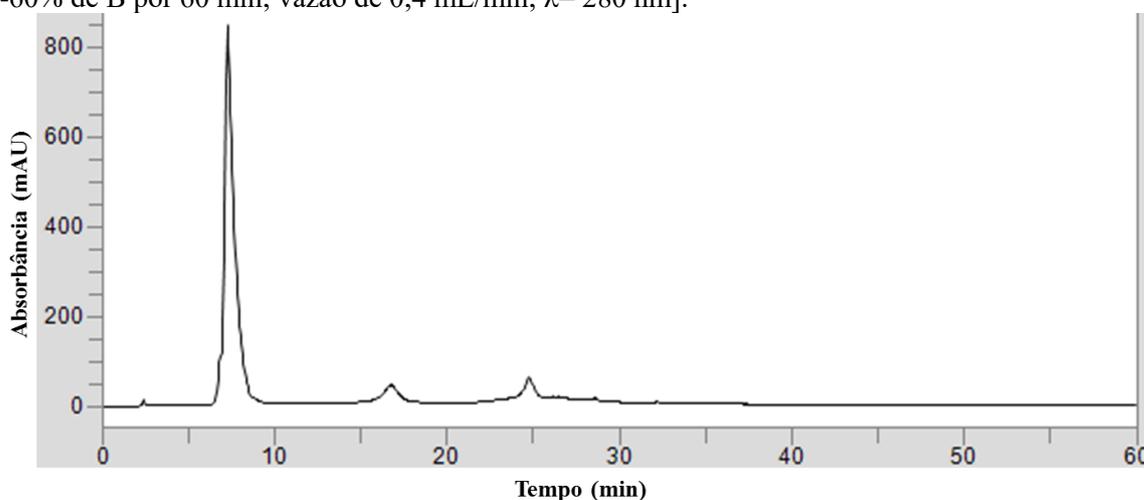


1: ácido gálico; 2: galato de metila; 3: galato de etila

Fonte: Autora

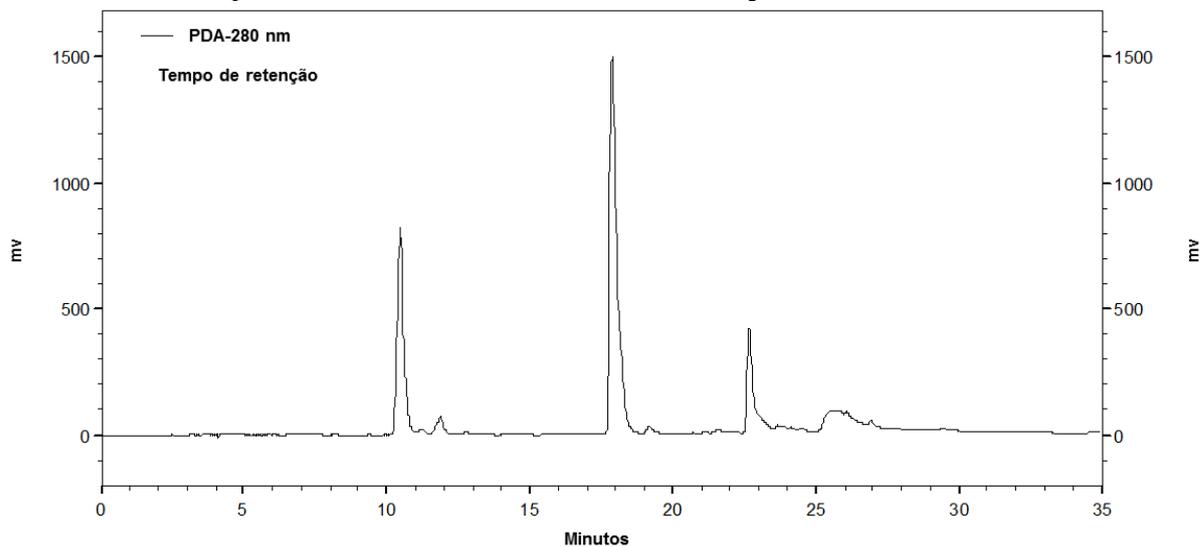
Foram também identificados os demais componentes do extrato (picos 1 e 2) através da co-injeção com padrões e análise por RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C. As Figuras 35 e 36 apresentam os cromatogramas onde foi realizada a co-injeção com os padrões de ácido gálico (Figura 37) e galato de metila (Figura 38), respectivamente. Os dados espectrométricos do galato de metila estão apresentados na Tabela 11 e os espectros de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C nas Figuras 39 e 40, respectivamente. A identificação da substância galato de etila na subfração 7 (pico 3) foi novamente confirmada através da co-injeção com seu padrão (Figura 41).

**Figura 35.** Cromatograma do extrato + padrão de ácido gálico em CLAE-UV no modo analítico [Coluna Hypersil Gold® C<sub>18</sub>, 250 x 4,6 mm, 5 µm; Solvente A: H<sub>2</sub>O; Solvente B: ACN. Gradiente de 15-60% de B por 60 min; vazão de 0,4 mL/min; λ= 280 nm].



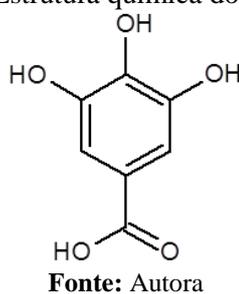
Fonte: Autora

**Figura 36.** Cromatograma do extrato + padrão de galato de metila obtido em CLAE-DAD no modo analítico [Coluna Phenomenex® Synergi Hydro C<sub>18</sub>, 250 x 4,6 mm, 4 μm; Solvente A: H<sub>2</sub>O + 0,01% TFA; Solvente B: metanol + 0,01% TFA. Gradiente de 5-50 % de B por 30 min, de 50-100% de B por 5 min e 100% de B por 10 min; vazão de 1 mL/min; λ= 280 nm].

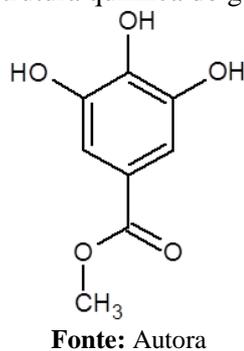


Fonte: Autora

**Figura 37.** Estrutura química do ácido gálico.



**Figura 38.** Estrutura química do galato de metila.



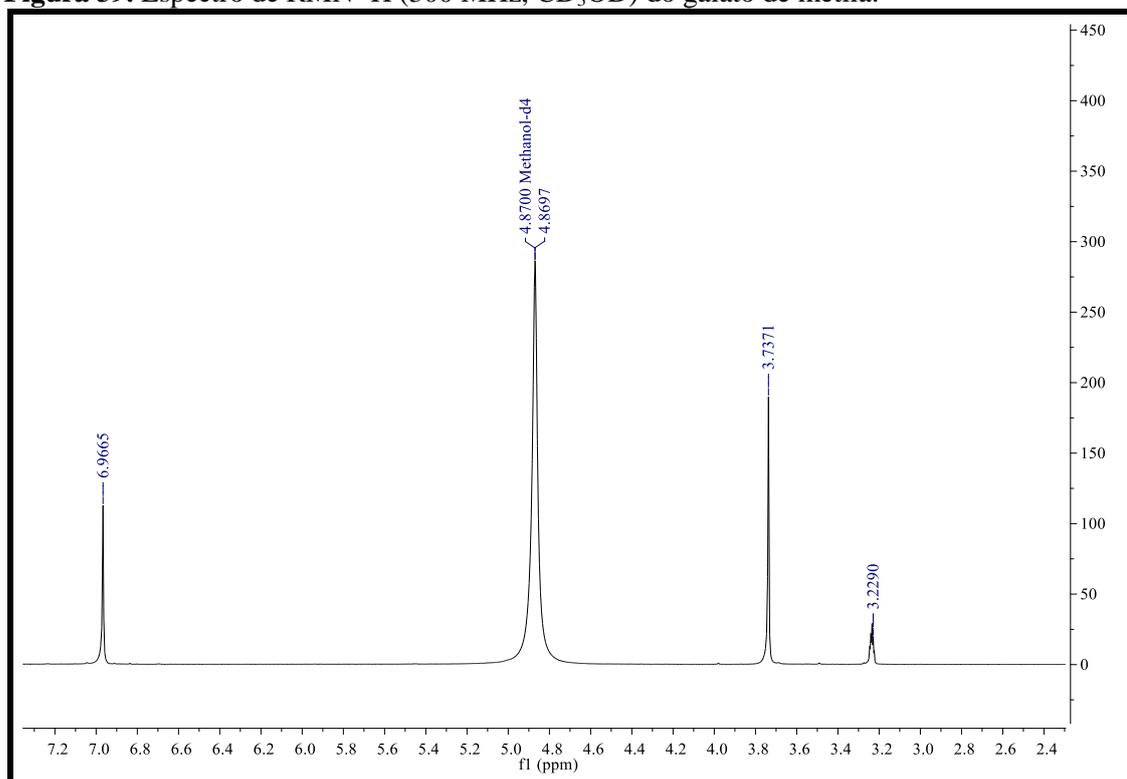
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Tabela 11.** Dados espectrométricos de RMN obtidos para o galato de metila a 300 MHz para  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

| C | $^{13}\text{C}^*$ | $^1\text{H} J(\text{Hz})^*$ | $^{13}\text{C}$ | $^1\text{H} J(\text{Hz})$ |
|---|-------------------|-----------------------------|-----------------|---------------------------|
| 1 | 120,53            | -                           | 121,35          | -                         |
| 2 | 109,72            | 6,90 <i>s</i>               | 110,01          | 6,97 <i>s</i>             |
| 3 | 144,38            | -                           | 146,48          | -                         |
| 4 | 137,95            | -                           | 139,80          | -                         |
| 5 | 144,38            | -                           | 146,48          | -                         |
| 6 | 109,72            | 6,90 <i>s</i>               | 110,01          | 6,97 <i>s</i>             |
| 7 | 168,84            | -                           | 169,0           | -                         |
| 8 | 52,42             | 3,74 <i>s</i>               | 52,29           | 3,74 <i>s</i>             |

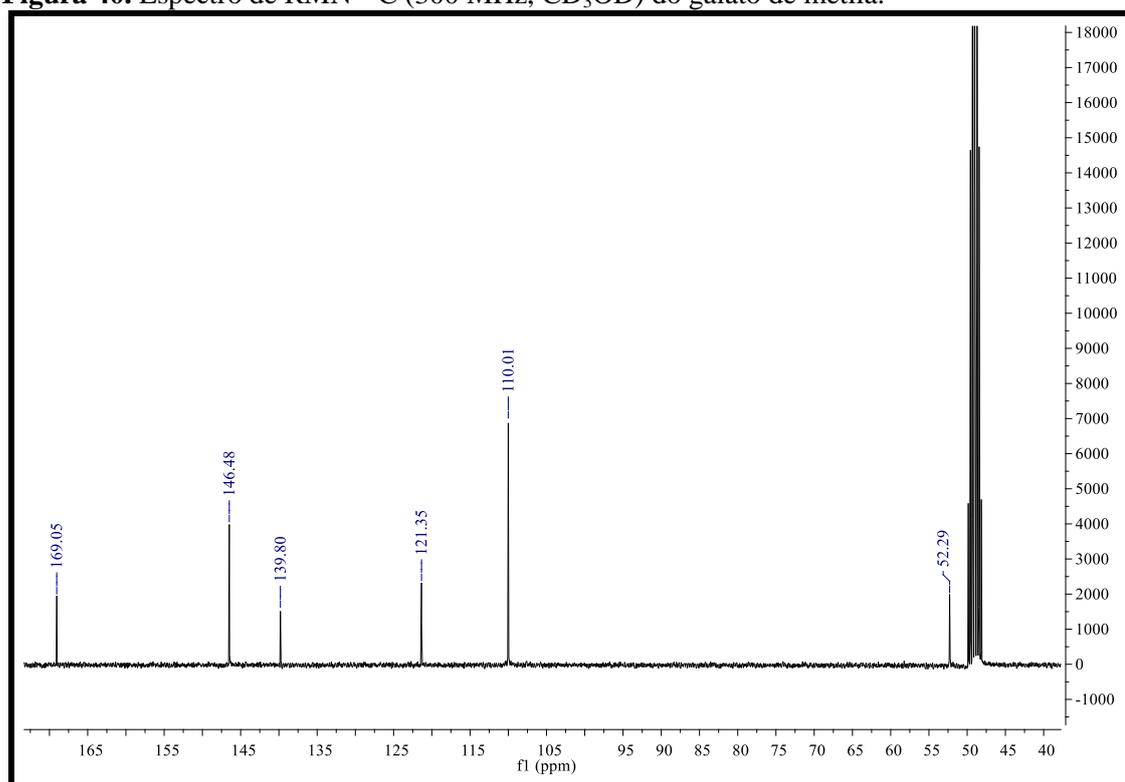
\*Dados de RMN do galato de metila obtidos em  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$  à 400 e 220 MHz, respectivamente para  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , segundo Subramanian et al., 2016.

**Figura 39.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do galato de metila.



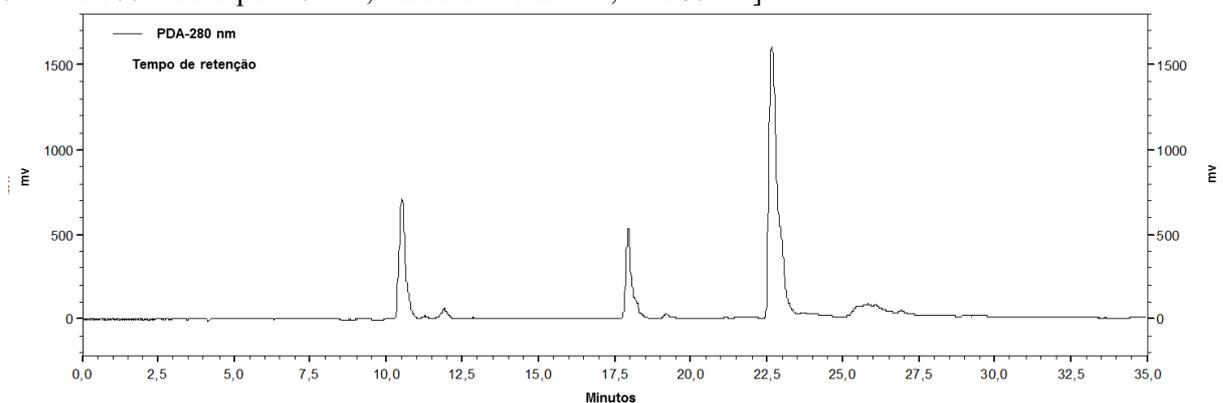
Fonte: Autora

**Figura 40.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do galato de metila.



Fonte: Autora

**Figura 41.** Cromatograma do extrato + padrão de galato de etila obtido em CLAE-DAD no modo analítico [Coluna Phenomenex<sup>®</sup> Synergi Hydro  $\text{C}_{18}$ , 250 x 4,6 mm, 4  $\mu\text{m}$ ; Solvente A:  $\text{H}_2\text{O}$  + 0,01% TFA; Solvente B: metanol + 0,01% TFA. Gradiente de 5-50% de B por 30 min, de 50-100% de B por 5 min e 100% de B por 10 min; vazão de 1 mL/min;  $\lambda = 280 \text{ nm}$ ].



Fonte: Autora

Como mencionado, a subfração 7, composta do galato de etila juntamente com PGG, foi considerada a subfração mais ativa e responsável pela atividade antifúngica frente às cepas de *Candida* sp. Devido ao baixo rendimento desta subfração, decidiu-se testar o padrão de galato de etila isoladamente frente a estas cepas fúngicas e, conforme observado na Tabela 12,

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

os resultados mostraram que este composto apresenta atividade biológica apenas contra a espécie *C. glabrata*, podendo-se inferir que a atividade contra a espécie *C. albicans* é dada pela presença do composto juntamente ao galato de etila, ou, até mesmo devido a um sinergismo entre estas duas substâncias. O padrão de galato de metila apresentou exatamente os mesmos valores de CIM do galato de etila frente a todas as cepas fúngicas, enquanto que o padrão de ácido gálico não apresentou atividade contra nenhuma espécie de *Candida* sp. testada.

**Tabela 12.** Valores de CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) do extrato e substâncias identificadas através da revelação com TTC (2%).

| Amostra          | Cepa<br><i>C. albicans</i><br>ATCC 10231 | <i>C. albicans</i><br>CAV3 | <i>C. albicans</i><br>SC5314 | <i>C. glabrata</i><br>ATCC 2001 | <i>C. glabrata</i><br>CGV 3 |
|------------------|--|----------------------------|------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| Extrato          | 15,62                                    | 62,5                       | 31,25                        | 0,24                            | 62,5                        |
| Ácido gálico     | >1000                                    | >1000                      | >1000                        | >1000                           | >1000                       |
| Galato de metila | >1000                                    | >1000                      | >1000                        | 15,62 - 7,81                    | 125                         |
| Galato de etila  | >1000                                    | >1000                      | >1000                        | 15,62 - 7,81                    | 125                         |

Alguns estudos na literatura relatam a atividade antifúngica do ácido gálico e seus derivados. Alves et al. (2014) avaliaram a atividade antifúngica de alguns compostos fenólicos que foram identificados nas flores *Castanea sativa*, *Filipendula ulmaria*, *Rosa micrantha* e *Cytisus multiflorus* em determinadas regiões de Portugal. Dentre os compostos identificados, o ácido gálico se destacou ao apresentar a melhor atividade antifúngica contra espécies de *Candida* sp. (*C. albicans* ATCC 90028: <156  $\mu\text{g/mL}$ ; *C. glabrata* ATCC 2001: <156  $\mu\text{g/mL}$ ) incluindo células planctônicas e biofilmes. Li et al. (2017) estudaram o efeito *in vitro* e *in vivo* do ácido gálico e os resultados mostraram significativa atividade contra diversos isolados de *Candida* sp., com destaque para *C. albicans* a qual mostrou-se mais sensível ao apresentar um valor de CIM de 12,5  $\mu\text{g/mL}$ . Os autores investigaram também o possível mecanismo de ação envolvido nesta atividade e comprovaram que o ácido gálico reduziu a atividade da enzima lanosterol 14- $\alpha$  demetilase. Teodoro et al. (2015) publicaram um artigo de revisão com diversos estudos que relatam o uso eficaz dos ácidos fenólicos, incluindo o ácido gálico, como agentes de tratamento contra espécies de *Candida* sp. São poucos os

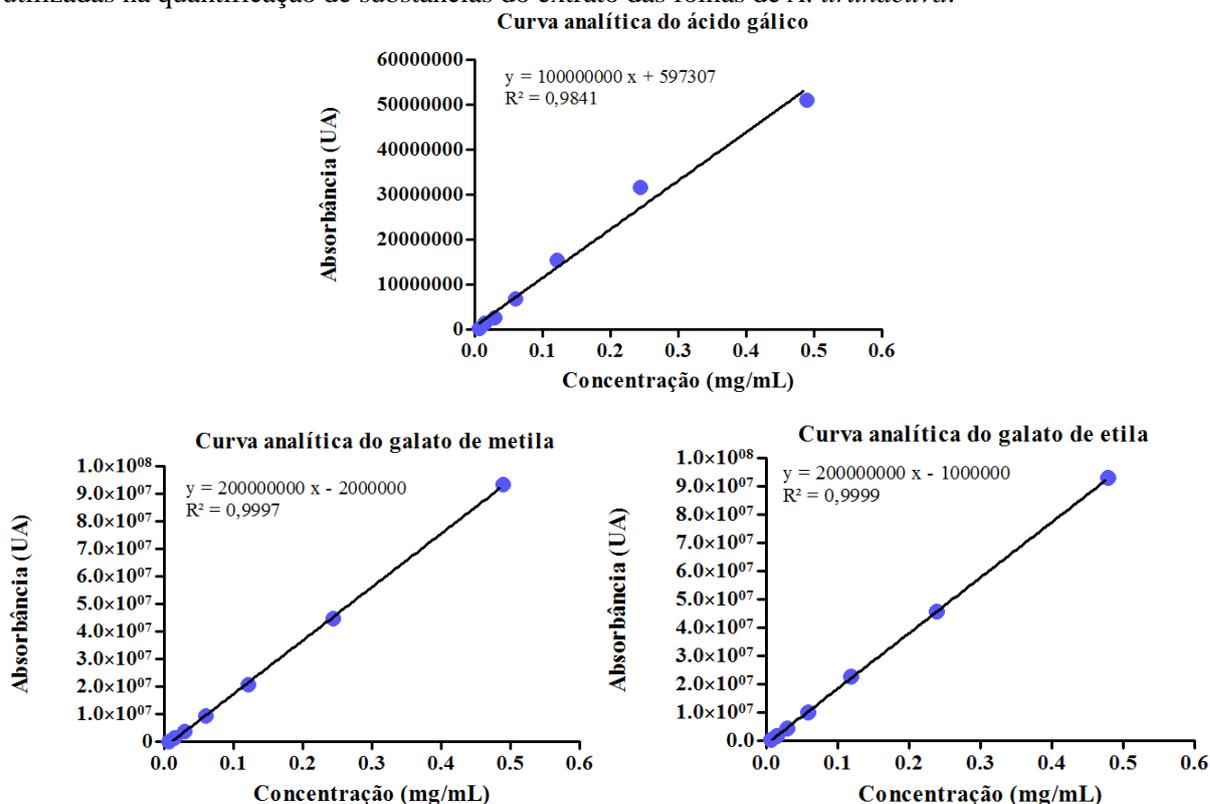
estudos encontrados na literatura que relatam a atividade antimicrobiana dos compostos galato de metila e etila, principalmente no que se diz respeito à atividade antifúngica contra as cepas de *Candida* sp. testadas. Girardot e Imbert (2016) relataram a atividade antifúngica de diversos componentes de extratos vegetais e dentre estes, comprovaram que os compostos fenólicos apresentam forte atividade antifúngica contra cepas de *C. albicans* e *C. glabrata*, o que confirma os resultados obtidos em nosso estudo.

Conforme mencionado anteriormente, a presença de galato de metila no extrato pode ser consequência do processo de degradação (metanólise) a partir do PGG. Em relação ao galato de etila, ainda não é possível afirmar se este é um produto de degradação do extrato formado a partir da etanolise devido à presença de etanol utilizado durante o processo de percolação, ou se esta substância também pode ser considerada um metabólito secundário da planta. O processo de degradação pode ocorrer com frequência durante o preparo e análise de extratos e, embora este processo resulte na formação de outras substâncias, é importante que estas também sejam estudadas uma vez que tal processo pode também ocorrer no organismo humano. O *A. urundeuva* é bastante utilizada popularmente para o tratamento de gastrites e úlceras, sendo que tal propriedade foi comprovada por diversos estudos (CARLINI et al., 2010; CARTAXO et al., 2010). Supondo que esta planta seria utilizada para tal finalidade por via oral, pode ser que, no trato gastrintestinal, os taninos presentes atuem na úlcera por se complexarem com macromoléculas como polissacarídeos e proteínas, mas pode ser também que parte de seus metabólitos secundários sejam degradados e venham a formar os produtos de degradação, e estes sejam os responsáveis pela atividade. Desta maneira, se faz necessário levar também em consideração possíveis produtos de degradação gástrica e metabólitos dos taninos para compreender seu real mecanismo de ação (SIMÕES et al., 2017). Supondo que o galato de etila também seja considerado um metabólito secundário da planta, assim como o galato de metila, estes já estariam atuando mesmo sem o processo de degradação e, caso esta ocorra, a tendência seria a formação de uma maior quantidade de ácido gálico a partir do galato de metila e etila.

### **5.10. Quantificação das substâncias identificadas no extrato das folhas de *A. urundeuva***

As médias das áreas dos picos cromatográficos das substâncias foram intercaladas em função da concentração e, através de regressão linear foram obtidas as curvas analíticas (Figura 42). Os ensaios foram realizados em triplicata.

**Figura 42.** Curvas analíticas para as soluções padrão de ácido gálico, galato de metila e galato de etila utilizadas na quantificação de substâncias do extrato das folhas de *A. urundeuva*.



Fonte: Autora

Os resultados obtidos através do ensaio de quantificação do ácido gálico, galato de metila e galato de etila estão apresentados nas Tabelas 13, 14 e 15, respectivamente.

**Tabela 13.** Dados obtidos na quantificação de ácido gálico no extrato hidroetanólico das folhas de *A. urundeuva*.

| Concentração (mg/mL) | $t_R$ (min) | Área do pico | Concentração corrigida (mg/mL)* |
|----------------------|-------------|--------------|---------------------------------|
| 0,5                  | 7,2         | 50939811,1   | 0,4895                          |
| 0,25                 | 7,3         | 31689185,5   | 0,24475                         |
| 0,125                | 7,3         | 15479220,75  | 0,122375                        |
| 0,0625               | 7,4         | 6847277,9    | 0,0611875                       |
| 0,03125              | 7,3         | 2545646,867  | 0,03059375                      |
| 0,015625             | 7,3         | 1361249,467  | 0,015296875                     |
| 0,0078125            | 7,1         | 295266,6667  | 0,007648438                     |

\*Concentração calculada considerando a pureza de 97,9%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Tabela 14.** Dados obtidos na quantificação de galato de metila no extrato hidroetanólico das folhas de *A. urundeuva*.

| Concentração<br>(mg/mL) | t <sub>R</sub> (min) | Área do pico | Concentração corrigida<br>(mg/mL)* |
|-------------------------|----------------------|--------------|------------------------------------|
| 0,5                     | 15,5                 | 93360966     | 0,49                               |
| 0,25                    | 16,2                 | 44684727,35  | 0,245                              |
| 0,125                   | 15,6                 | 20668000,37  | 0,1225                             |
| 0,0625                  | 16,2                 | 9293723,1    | 0,06125                            |
| 0,03125                 | 16,1                 | 3633145,133  | 0,030625                           |
| 0,015625                | 15,8                 | 1169831,1    | 0,0153125                          |
| 0,0078125               | 16,7                 | 89874,9      | 0,00765625                         |

\*Concentração calculada considerando a pureza de 98%.

**Tabela 15.** Dados obtidos na quantificação de galato de etila no extrato hidroetanólico das folhas de *A. urundeuva*.

| Concentração<br>(mg/mL) | t <sub>R</sub> (min) | Área do pico | Concentração corrigida<br>(mg/mL)* |
|-------------------------|----------------------|--------------|------------------------------------|
| 0,5                     | 23,6                 | 92908999,17  | 0,48                               |
| 0,25                    | 24,4                 | 45511079,23  | 0,24                               |
| 0,125                   | 23,7                 | 22724228,45  | 0,12                               |
| 0,0625                  | 24,5                 | 10146742,1   | 0,06                               |
| 0,03125                 | 24,4                 | 4195059,667  | 0,03                               |
| 0,015625                | 23,7                 | 1544995,067  | 0,015                              |
| 0,0078125               | 24,7                 | 351262,5333  | 0,0075                             |

\*Concentração calculada considerando a pureza de 96%.

Os cálculos da concentração das substâncias assim como seu teor no extrato foram obtidos segundo os dados da Tabela 16.

**Tabela 16.** Teor das substâncias identificadas no extrato hidroetanólico das folhas de *A. urundeuva*.

| Substância       | Área do pico | Concentração (mg/mL) | Teor (%) |
|------------------|--------------|----------------------|----------|
| Ácido gálico     | 3818472,9    | 0,0322               | 0,32     |
| Galato de metila | 19710333,5   | 0,1085               | 1,08     |
| Galato de etila  | 53811662,0   | 0,2740               | 2,74     |

Ao identificar o pico da substância de interesse no cromatograma do extrato foi considerado o valor de sua absorvância e substituída na equação da reta (y) e então, obtido o valor correspondente ao x, ou seja, a concentração que esta substância encontra-se no extrato. Para o ácido gálico, por exemplo, a área do pico correspondente a esta substância no extrato foi de 3818472,9 que, ao ser substituído pelo y na equação da reta obtida, resultou no valor de  $x = 0,0322$ , ou seja, em uma concentração de 0,0322 mg/mL. Se 10 mg/mL (concentração do extrato utilizada na quantificação) corresponde a 100%, 0,0322 mg/mL corresponde a 0,32%. O mesmo cálculo foi realizado para as demais substâncias.

Quando este mesmo extrato havia sido avaliado em 2009 por Souza (2012), as substâncias: ácido gálico, galato de metila, PGG e galato de etila também haviam sido identificadas, sendo as três primeiras analisadas quantitativamente. Entretanto, pode-se perceber redução no teor das substâncias ácido gálico e galato de metila quando quantificadas novamente em nosso estudo: o teor de ácido gálico passou de 3,83% para 0,32% e o de galato de metila de 6,07% para 1,08%, sendo que esta redução nos valores pode estar associada ao processo de degradação que vem ocorrendo, uma vez que o processo de obtenção do extrato foi realizado no ano de 2012.

### 5.11. Estudos de combinação entre as substâncias identificadas

A Tabela 17 mostra os resultados obtidos para a combinação das substâncias identificadas entre si (ácido gálico, galato de metila e galato de etila) contra *C. albicans* SC5314 e *C. glabrata* ATCC 2001 (os valores de ICIF estão apresentados entre parênteses).

**Tabela 17.** Efeito inibitório do ácido gálico, galato de metila e galato de etila combinados entre si em *Candida albicans* SC5314 e *Candida glabrata* ATCC 2001.

| Cepa                               | <i>Candida albicans</i> | <i>Candida glabrata</i> |
|------------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Combinação                         | SC5314                  | ATCC 2001               |
| Ácido gálico x Galato de metila    | Indiferença             | Sinergismo (0,37)       |
| Ácido gálico x Galato de etila     | Indiferença             | Indiferença             |
| Galato de metila x Galato de etila | Indiferença             | Indiferença             |
| Sinergismo                         | ICIF < 0,5              |                         |
| Indiferença                        | IFIC > 0,5 – 4,0        |                         |
| Antagonismo                        | IFIC > 4,0              |                         |

Números dados em parênteses indicam ICIF para combinações que representam sinergismo.

Após a identificação das substâncias isoladas, avaliou-se combinação das mesmas entre si com o objetivo de verificar se a atividade poderia ser aprimorada. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 17, pode-se observar que nenhuma das substâncias foi capaz de se mostrar eficaz contra a espécie de *C. albicans* SC5314 mesmo quando combinadas entre si. Para espécie *C. glabrata* ATCC 2001, o ácido gálico que não havia apresentado atividade quando avaliado sozinho, passou a apresentar quando em combinação com o galato de metila, uma vez que apresentou um valor de ICIF inferior a 0,5. Para as demais combinações não foi observado efeito sinérgico (HINDLER, 1995). Esses resultados permitem inferir que os componentes minoritários do extrato contribuem de fato para a atividade antifúngica do extrato apresentada das espécies de *Candida* sp., especialmente no que se diz respeito a espécie *C. albicans*.

### 5.12. Incorporação no sistema nanoestruturado

Primeiramente, quando a subfração 7 foi identificada como a mais ativa obtida do processo de fracionamento, optou-se por incorporá-la também na ME desenvolvida, além do extrato bruto, com o objetivo de avaliar se esta subfração por apresentar-se mais seletiva, poderia apresentar uma maior atividade após incorporada do que em relação ao extrato. Os valores de CIM do extrato, subfração 7 e substâncias isoladas livres ou incorporados estão apresentados na Tabela 18.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Tabela 18.** Valores de CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) do extrato, subfração 7 e substâncias isoladas através da revelação com TTC (2%).

| Cepa fúngica                |        | <i>Ca</i><br>ATCC 10231 | <i>Ca</i><br>CAV3 | <i>Ca</i><br>SC5314 | <i>Cg</i><br>ATCC 2001 | <i>Cg</i><br>CGV 3 |
|-----------------------------|--------|-------------------------|-------------------|---------------------|------------------------|--------------------|
| Amostra                     |        |                         |                   |                     |                        |                    |
| <b>Extrato</b>              | Livre  | 15,62                   | 62,5              | 31,25               | 0,24                   | 62,5               |
|                             | + ME A | 15,62                   | 62,5              | 31,25               | 0,24                   | 62,5               |
|                             | + ME B | 15,62                   | 62,5              | 31,25               | 0,24                   | 62,5               |
| <b>Subfração<br/>7</b>      | Livre  | 15,62                   | 62,5              | 31,25               | 0,24                   | 62,5               |
|                             | + ME A | 15,62                   | 62,5              | 31,25               | 0,24                   | 62,5               |
| <b>Ácido<br/>gálico</b>     | Livre  | > 1000                  | > 1000            | > 1000              | >1000                  | > 1000             |
| <b>Galato<br/>de metila</b> | Livre  | >1000                   | >1000             | >1000               | 15,62-7,81             | 125                |
| <b>Galato<br/>de etila</b>  | Livre  | >1000                   | >1000             | >1000               | 15,62-7,81             | 125                |
|                             | + ME A | >1000                   | >1000             | >1000               | 15,62-7,81             | 125                |

Ca: *C. albicans*; Cg: *C. glabrata*

Conforme já mencionado, a subfração 7 apresentou valores de CIM idênticos aos apresentados pelo extrato. Pode-se observar que após a incorporação tanto do extrato, como da subfração 7 e substâncias isoladas a partir do extrato, que os valores de CIM foram mantidos, ou seja, as amostras apresentaram a mesma atividade antifúngica de quando analisados sem incorporação.

Outra observação interessante é que apesar do galato de metila e galato de etila terem apresentado a mesma atividade antifúngica frente a todas as cepas de *Candida* sp testadas, quando estas substâncias são comparadas com a subfração 7 e extrato como um todo, pode-se notar que tais substâncias apresentam valores de CIM maiores, ou seja, menor atividade antifúngica. Esse fato poderia ser explicado devido a um possível efeito sinérgico entre tais substâncias e os demais constituintes minoritários do extrato que podem conferir uma maior atividade. Além disso, pode-se notar também que o ácido gálico não apresentou atividade para nenhuma das cepas testadas, diferentemente do galato de metila e galato de etila que apresentaram atividade para as cepas de *C. glabrata*. Esse resultado pode ser explicado provavelmente devido a relação estrutura x atividade, no qual a introdução de grupamentos

poderia estar aumentando a atividade devido a uma maior interação com a membrana da célula fúngica (REIS, et al., 2010): Nogueira et al. (2009) publicou um artigo no qual menciona as diversas atividades biológicas relatadas pelos carboidratos e no que diz respeito a atividade antifúngica apresenta um estudo no qual foram sintetizadas 8 glicosilaminas a partir da glicose, com diferentes tamanhos de cadeia os quais variaram de 2 a 10 carbonos. Tais amostras foram testadas contra os fungos *Coriolus versicolor* e *Poria placenta* e os resultados mostraram aumento da atividade antifúngica conforme o aumento da cadeia carbônica.

Cabe mencionar que os controles dos solventes utilizados (DMSO e microemulsão base) não apresentaram atividade frente às cepas de *Candida* sp testadas, ou seja, não inibiram o crescimento fúngico, garantindo dessa forma que a atividade apresentada tenha sido exclusivamente exibida pelo amostra testada e não por quaisquer outras interferências, como pelo DMSO ou pelos componentes que constituem as MEs. Devido ao baixo rendimento das substâncias isoladas do extrato e da subfração 7, optou-se por realizar o ensaio *in vivo* com o extrato bruto. Além disso, as substâncias isoladas não apresentaram atividade antifúngica para a espécie *C. albicans*, que seria utilizada no ensaio *in vivo*. Tais resultados indicam possivelmente um grande efeito sinérgico entre os constituintes do extrato que conferem atividade a espécie *C. albicans*, já que o extrato bruto apresentou atividade e as substâncias isoladas a partir deste, não. Já para a espécie *C. glabrata*, os resultados indicaram forte atividade de tais substâncias isoladas, mas ainda assim o extrato bruto mostrou-se mais promissor ao apresentar maior atividade, ou seja, menores valores de CIM tanto para a cepa padrão ATCC 2001 quanto para a cepa clínica.

Diante disso, o extrato também foi incorporado na ME B e submetido ao ensaio *in vitro* já que este também seria utilizado no ensaio *in vivo*. No entanto, os resultados não mostraram diferença de atividade entre as MEs com e sem Poloxamer®.

### 5.13. Concentração fungicida mínima (CFM)

A CFM foi realizada para todas as amostras vegetais. Os poços das microplacas que apresentaram ausência de crescimento (atividade antifúngica) foram plaqueados e posteriormente analisados pelo crescimento das cepas. Enquanto que as substâncias isoladas do extrato apresentaram efeito fungicida para as duas espécies testadas, o extrato apresentou um comportamento diferente de acordo com determinadas concentrações.

Para a espécie *C. albicans* e *C. glabrata*, tanto cepas padrão como isolados clínicos, pode-se observar um efeito fungicida do extrato livre apenas até a concentração de 125 µg/mL

e, um efeito fungistático em concentrações condizentes com os valores de CIM apresentados para cada cepa [*C. albicans* ATCC 10231 (15,62 µg/mL); CAV3 (62,5 µg/mL); *C. albicans* SC5314 (31,25 µg/mL); *C. glabrata* ATCC 2001 (0,24 µg/mL) e CAV3 (62,5 µg/mL)], já que nestas concentrações apresentaram ausência de crescimento nos poços da microplaca e presença de crescimento quando expostos a condições favoráveis de crescimento no ágar.

Após incorporação do extrato na ME, pode-se observar um efeito fungicida exatamente na mesma concentração dos valores de CIM determinados para cada cepa. Esse resultado poderia ser explicado possivelmente devido a presença do colesterol como FOI da ME que pode ter promovido uma possível interação com a membrana fúngica composta de ergosterol e então permitido uma maior entrada da substância ativa para dentro da célula fúngica (BONIFÁCIO et al., 2015).

### 5.14. Caracterização estrutural das microemulsões

A Tabela 19 apresenta os valores das médias e desvio-padrão dos tamanhos das partículas e do índice de polidispersidade (IPD) para as MEs (base) e para os extratos incorporados nas MEs. O IPD mede a homogeneidade entre a média dos tamanhos das partículas em relação ao desvio-padrão, onde quanto menor o IPD, maior a homogeneidade da amostra apresentada pelas partículas (GOYAL et al., 2012).

**Tabela 19.** Valores das médias e desvio-padrão dos tamanhos das partículas e IPD para as MEs base A e B e para os extratos incorporados na microemulsão (ME) após o preparo.

| ME | Tamanho das Partículas (nm) | IPD            |
|----|-----------------------------|----------------|
| A  | Base                        | 117,2 ± 1,966  |
|    | AUF                         | 146,7 ± 1,825  |
| B  | Base                        | 117,90 ± 0,143 |
|    | AUF                         | 124,63 ± 0,881 |

ME: microemulsão; IPD: índice de polidispersidade

Ao analisar os dados de tamanho de partículas para ambas as bases (ME A e ME B), observa-se um aumento do diâmetro médio após a incorporação do extrato em ambas as formulações, sendo este um forte indício de que ocorreu efetivamente a incorporação. No que diz respeito ao IPD, observa-se que os valores tanto das bases quanto das formulações contendo o extrato variaram entre  $0,167 \pm 0,015$  e  $0,255 \pm 0,010$ , esses dados permitem inferir

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

que as amostras são homogêneas e ainda pode-se afirmar que as formulações B são mais homogêneas do que as formulações A, uma vez que os valores são menores quando comparados (MOGHIMIPOUR, SÂLIMI e EFTEKHARI, 2013).

### 5.15. Ensaio de Toxicidade

#### 5.15.1. Determinação da citotoxicidade em linhagens celulares

Os resultados de IC<sub>50</sub> do extrato livre e incorporado na ME A frente às linhagens VERO, MRC-5 e HaCaT, bem como os valores de IS estão sumarizados na Tabela 20.

**Tabela 20.** Resultados da CIM (µg/mL) frente às cepas de *Candida* sp, do IC<sub>50</sub> (µg/mL) sobre as linhagens celulares VERO e MRC-5 e o valor do IS da razão entre esses dois resultados do extrato hidroetanólico das folhas de *A. urundeuva* livre ou na microemulsão (ME).

| Cepa          | Extrato | CIM   | IC <sub>50</sub><br>VERO | IS      | IC <sub>50</sub><br>MRC-5 | IS      | IC <sub>50</sub><br>HaCaT | IS     |
|---------------|---------|-------|--------------------------|---------|---------------------------|---------|---------------------------|--------|
| Ca<br>10231   | Livre   | 15,62 | 536,1                    | 34,32   | 360                       | 23,04   | 158                       | 10,12  |
|               | +ME A   | 15,62 | >1000                    | ≥64,02  | 380                       | 24,32   | 110                       | 7,04   |
| CAV3          | Livre   | 62,5  | 536,1                    | 8,58    | 360                       | 5,76    | 158                       | 2,53   |
|               | +ME A   | 62,5  | >1000                    | ≥16,00  | 380                       | 6,08    | 110                       | 1,76   |
| Ca<br>SC5314  | Livre   | 31,25 | 536,1                    | 17,16   | 360                       | 11,52   | 158                       | 5,06   |
|               | +ME A   | 31,25 | >1000                    | 32,00   | 380                       | 12,16   | 110                       | 3,52   |
| Cg<br>2001    | Livre   | 0,24  | 536,1                    | 2233,75 | 360                       | 1500,00 | 158                       | 658,33 |
|               | +ME A   | 0,24  | >1000                    | 4166,66 | 380                       | 1583,33 | 110                       | 458,33 |
| CGV3          | Livre   | 62,5  | 536,1                    | 8,58    | 360                       | 5,76    | 158                       | 2,53   |
|               | +ME A   | 62,5  | >1000                    | ≥16,00  | 380                       | 6,08    | 110                       | 1,76   |
| Doxorrubicina |         |       | 4,36                     |         | 1,90                      |         | 6,79                      |        |

Ca: *C. albicans*; Cg: *C. glabrata*

Ao analisar os resultados de citotoxicidade frente à linhagem VERO, pode-se observar que o extrato incorporado na ME A apresentou um IC<sub>50</sub> maior (>1000 µg/mL) em relação ao extrato livre (536,1 µg/mL), mas, ambas as amostras não apresentaram toxicidade, pois os valores de IC<sub>50</sub> foram 229 e 123 vezes, respectivamente, maior do que o IC<sub>50</sub> da

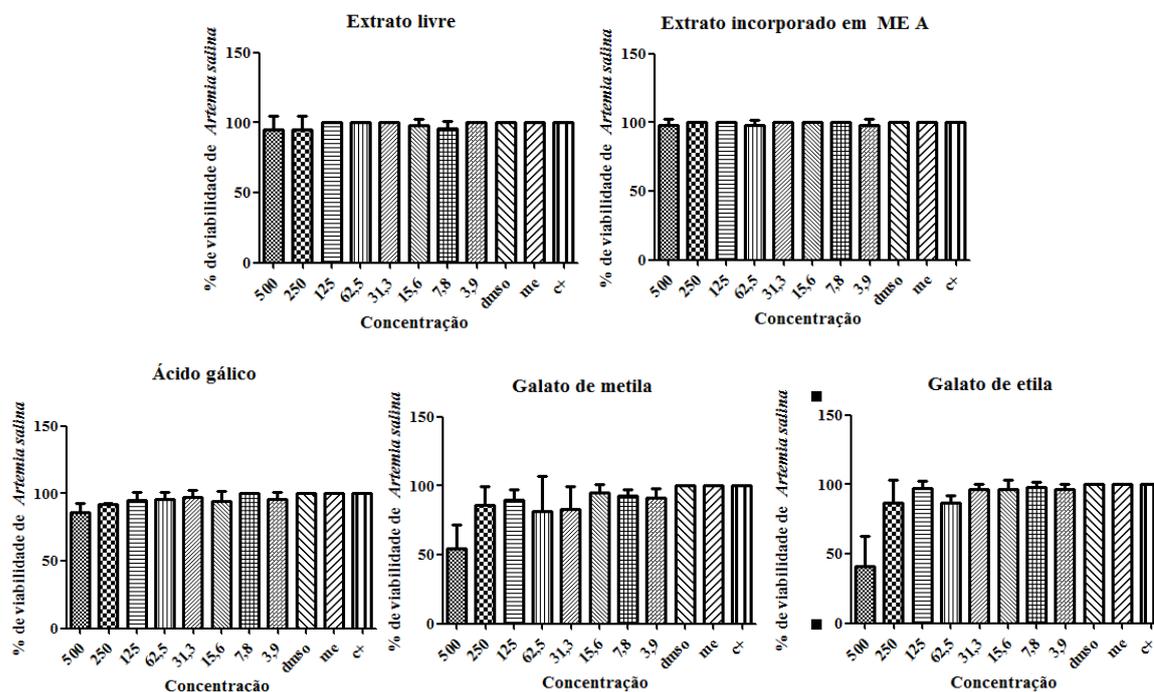
doxorubicina, fármaco padrão utilizado na terapia, que é 4,36 µg/mL para esta linhagem celular. Já para a linhagem celular MRC-5 (fibroblasto pulmonar), o extrato livre apresentou um valor de IC<sub>50</sub> menor (360 µg/mL) e ao incorporar o extrato na ME A, observou-se que o IC<sub>50</sub> praticamente se manteve (IC<sub>50</sub>= 380 µg/mL), ou seja, ambas as amostras apresentaram uma menor viabilidade celular para esse tipo de célula em relação à linhagem anterior, porém, não apresentaram toxicidade ao serem comparadas com a doxorubicina que tem um IC<sub>50</sub> de 1,90 µg/mL frente à MRC-5. Para a linhagem HaCaT, pode-se observar uma maior toxicidade ao apresentar valores de IC<sub>50</sub> inferiores em relação a linhagem MRC-5, mas, maiores do que o valor de IC<sub>50</sub> da doxorubicina em 23 e 16 vezes para o extrato livre e incorporado na ME A, respectivamente. A redução da viabilidade celular de uma linhagem para a outra pode estar relacionada a uma maior sensibilidade das linhagens MRC5 e HaCaT já que tais se tratam de linhagens humanas e não de primata como a VERO. De acordo com Meyer et al (1982) amostras de extratos de produtos naturais com IC<sub>50</sub> > 30 µg/mL são consideradas não tóxicas, portanto, as amostras estudadas neste trabalho não apresentaram toxicidade.

Entretanto, para que determinada amostra seja classificada ou não como promissora, também se faz necessário avaliar os resultados de CIM e IC<sub>50</sub> em conjunto resultando no índice de seletividade (IS). O IS é dado pela razão entre o IC<sub>50</sub> e a CIM (ORME, 2001) e as amostras que apresentarem IS ≥10 podem ser aplicados na concentração de 10 ou mais vezes acima do valor de CIM sem apresentar citotoxicidade. Ao dividir o IC<sub>50</sub> obtido para linhagem VERO pelo CIM apresentado por cada cepa de *Candida* sp, pode-se observar que após incorporação todos os valores de IS aumentaram significativamente, com destaque frente a cepa de *C. glabrata* ATCC 2001, onde apresentou um IS cerca de 2 vezes maior após a incorporação na ME A. Quando o valor de IC<sub>50</sub> obtido para a linhagem MRC5 foi dividido pelo CIM de cada cepa, pode-se observar que o aumento do IS não foi tão significativo, já o extrato apresentou menor valor de IC<sub>50</sub>, ou seja, maior toxicidade frente a esta linhagem.

### **5.15.2. Avaliação da toxicidade aguda frente à *Artemia salina* L. (*Artemiidae*)**

Os resultados da CL<sub>50</sub> do extrato livre, extrato incorporado na ME A e substâncias padrão de ácido gálico, galato de metila e galato de etila frente à *Artemia salina* L. (*Artemiidae*) estão apresentados na Figura 43. Todas as amostras foram avaliadas nas mesmas concentrações, variando de 500 a 3,9 µg/mL.

**Figura 43.** Porcentagem de viabilidade de *Artemia salina* L. em relação a concentração das amostras utilizadas.



Fonte: Autora.

Ao analisar os gráficos da Figura 43, pode-se observar que tanto o extrato livre como incorporado na ME A permitiram a viabilidade de todos os náuplios mesmo quando avaliados na maior concentração (500 µg/mL), ou seja, não apresentaram toxicidade em todas as concentrações testadas.

Em relação aos padrões das substâncias identificadas no extrato de *A. urundeuva*, pode-se verificar o ácido gálico e o galato de metila permitiram uma menor viabilidade quando avaliado em sua maior concentração, em torno de 90 e 50%, respectivamente, mas ainda assim podem ter sua  $CL_{50}$  classificada como 500 µg/mL. O mesmo não pode ser dito para o galato de etila, que mostrou um maior grau de toxicidade ao permitir apenas 40% de viabilidade dos náuplios em sua maior concentração e, portanto, sua  $CL_{50}$  pode ser considerada concentrações em torno de no mínimo 250 µg/mL. Uma observação interessante ao analisar os gráficos é que o grau de toxicidade é maior conforme o aumento do tamanho da cadeia carbônica, ou seja, galato de etila apresenta maior toxicidade que o galato de metila e, este, menor que o ácido gálico. Este fato também poderia ser explicado pela relação de estrutura x atividade na qual quanto maior o tamanho da cadeia, maior a interação com determinada linhagem celular, aumentando dessa maneira o grau de toxicidade.

**5.16. Ensaio *in vivo***

Conforme já mencionado, o extrato livre e incorporado nas MEs A e B foi selecionado para ser utilizado no ensaio *in vivo*. A Tabela 21 apresenta o número de animais infectados e a média do número de UFC dos grupos de animais nos dias 2, 4, 6 e 8 de tratamento.

**Tabela 21.** Quantificação da carga fúngica obtida nos grupos.

| Grupos experimentais               | Carga fúngica (UFC/mL) durante o tratamento |                    |                 |                 |
|------------------------------------|---|--------------------|-----------------|-----------------|
|                                    | Dia 2                                       | Dia 4              | Dia 6           | Dia 8           |
| Controle negativo de infecção      | 0   | 0                  | 0               | 0               |
| Controle positivo de infecção      | 8217  | 10565              | 8799            | 8525            |
| Controle positivo (anfotericina B) | 5431  | 4559               | 3288            | 2684            |
| Solvente DMSO                      | 8354  | 11049              | 9704            | 8561            |
| Extrato livre (diluído em DMSO)    | 3619 <sup>a*</sup>                          | 1687 <sup>a*</sup> | 0 <sup>a*</sup> | 0 <sup>a*</sup> |
| ME base A                          | 7160  | 8597               | 6436            | 5924            |
| Extrato incorporado na ME A        | 2346 <sup>b*</sup>                          | 0 <sup>b*</sup>    | 0 <sup>a*</sup> | 0 <sup>a*</sup> |
| ME base B                          | 7067  | 8642               | 6491            | 5715            |
| Extrato incorporado na ME B        | 1032 <sup>c*</sup>                          | 0 <sup>b*</sup>    | 0 <sup>a*</sup> | 0 <sup>a*</sup> |

\*Letras iguais na coluna significam que, não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) ao nível de significância de 5 % no teste de Tukey; ME: microemulsão

Três dias após a indução da infecção (após 48 horas de incubação das placas onde foi semeado o fluído), os resultados mostraram crescimento fúngico em todas as placas onde foi semeado o fluído, ou seja, todas as ratas haviam sido infectadas. No 4º dia após o início do tratamento, amostras do fluído vaginal foram novamente coletadas para quantificação da carga fúngica, e pode-se observar que todos os animais dos grupos infectados mantinham infecção, com exceção dos grupos tratados com o extrato incorporado nas MEs A e B, que já haviam sido curados. Os animais tratados com o extrato livre também já começaram a apresentar redução significativa da carga fúngica, a qual foi ainda menor que o grupo tratado com anfotericina B. Após 6 dias de tratamento os animais do grupo tratado com o extrato livre haviam sido curados, enquanto que anfotericina B ainda não havia reduzido por completo a carga fúngica nem mesmo no último dia de tratamento. Os animais dos grupos controle do solvente do extrato livre - DMSO, da ME A e ME B ainda apresentavam carga fúngica

significativa até último dia de tratamento, garantindo dessa maneira que qualquer atividade manifestada fosse exclusivamente do extrato vegetal.

Conforme já mencionado, uma semana após o último dia de tratamento, os animais dos grupos tratamento (extrato livre, incorporado nas MEs A e B, e anfotericina B) continuaram recebendo lavagens diárias para verificar uma possível recidiva da infecção. Pode-se observar que os animais dos grupos tratados com a anfotericina B e com o extrato livre começaram novamente a apresentar infecção ao apresentar um número de UFC/mL significativo em seus fluídos vaginais. Os animais dos grupos tratados com o extrato incorporado nas MEs A e B permaneceram curados até o final do período de recidiva.

Embora os ensaios *in vitro* tenham mostrado um mesmo valor de CIM tanto para o extrato livre quanto para o extrato incorporado, no ensaio *in vivo* foi possível observar um melhor comportamento do extrato após incorporação nas MEs A e B, embora não tenha havido diferença entre as formulações com e sem Poloxamer<sup>®</sup>. Esse resultado poderia estar relacionado ao efeito fungicida causado pelo extrato quando esse encontra-se incorporado nas MEs, conforme foi observado na determinação da CFM, o que poderia ter causado uma maior interação com a membrana da célula fúngica, permitindo uma melhor entrega dos ativos para dentro da célula e, como consequência, a morte celular.

Diferenças encontradas entre resultados obtidos em ensaios *in vitro* e *in vivo* não costumam ser incomuns. Os ensaios *in vivo* são considerados de extrema importância uma vez que permitem a presença de reações metabólicas e fisiológicas que acontecem somente em um organismo superior. Já os ensaios *in vitro*, apesar de terem várias vantagens, apresentam algumas limitações, como por exemplo, o fato de não conseguir simular exatamente o comportamento que determinado ativo irá sofrer como se fosse em um organismo superior, o que pode, por consequência, apresentar diferentes resultados (BOECKEL, 2011).

### **Resultados obtidos no Doutorado Sanduíche**

#### **5.17. Amostras utilizadas**

Diante do baixo rendimento apresentado pela subfração mais ativa e substâncias isoladas, e da melhor atividade apresentada pelo extrato contra as duas espécies de *Candida* sp, este foi selecionado como a amostra principal para os experimentos realizados no doutorado sanduíche. Entretanto, com o objetivo de obter maiores informações sobre uma das substâncias identificadas na subfração 7 (galato de etila), decidiu-se testar a atividade

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

antifúngica do padrão desta substância [ethyl gallate  $\geq 96.0$  % purity, Sigma-Aldrich®] juntamente com o extrato frente às cepas de *Candida* sp. Portanto, as amostras utilizadas no doutorado sanduíche foram o extrato livre e incorporado na ME A, além do padrão de galato de etila, conforme já mencionado.

### 5.18. Eficácia frente coleção de cepas e isolados clínicos de *Candida albicans* e *Candida glabrata*

A Tabela 22 mostra os resultados da atividade antifúngica das amostras (galato de etila, extrato livre e incorporado) obtida para a coleção de isolados clínicos de *C. albicans* apresentando diferentes níveis de resistência ao fluconazol.

**Tabela 22.** Efeito inibitório ( $\mu\text{g/mL}$ ) do galato de etila, extrato livre e incorporado, e o fármaco convencional fluconazol contras os isolados clínicos de *Candida albicans*.

| Amostra<br>Cepa | Galato de etila   |                   | Extrato livre     |                   | Extrato+ME A      |                   | Fluconazol        |                   |
|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                 | CIM <sub>50</sub> | CIM <sub>90</sub> |
| 3034            | -                 | -                 | 125               | -                 | -                 | -                 | -                 | -                 |
| 4617            | 250               | -                 | 3,90              | 62,5-125          | -                 | -                 | 7,81              | -                 |
| 5106            | -                 | -                 | 31,25             | 62,5              | -                 | -                 | 7,81              | -                 |
| 6482            | 250               | -                 | 125               | 250-500           | -                 | -                 | 15,62-31,25       | -                 |
| 6191            | -                 | -                 | 0,97              | 1,95              | -                 | -                 | 31,25             | 125               |
| 2307            | 500               | -                 | 62,5              | 125               | -                 | -                 | >64               | >64               |
| 4380            | -                 | -                 | 3,90              | 125               | -                 | -                 | >64               | >64               |
| 412             | 500               | -                 | 62,5              | 125               | -                 | -                 | 62,5              | 125               |
| 4639            | 500               | -                 | 7,81              | 31,25             | -                 | -                 | 31,25             | 125               |
| 1691            | 250               | -                 | 31,25-<br>62,5    | 125               | -                 | -                 | -                 | -                 |
| 2440            | -                 | -                 | 250               | -                 | -                 | -                 | -                 | -                 |
| 3731            | -                 | -                 | 500               | -                 | -                 | -                 | 62,5              | -                 |
| SC5314          | -                 | -                 | 31,25             | 250               | -                 | -                 | 0,25              | 1-2               |

(-) maior que 500  $\mu\text{g/mL}$

Os resultados mostraram que o padrão de galato de etila não apresentou atividade contra nenhuma cepa de *C. albicans* enquanto que o extrato livre apresentou atividade contra *C. albicans* SC5314 na concentração de 125-250  $\mu\text{g/mL}$  (CIM<sub>90</sub>) e para a maioria dos isolados clínicos desta espécie testados, incluindo a cepa 6248, considerada um isolado

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

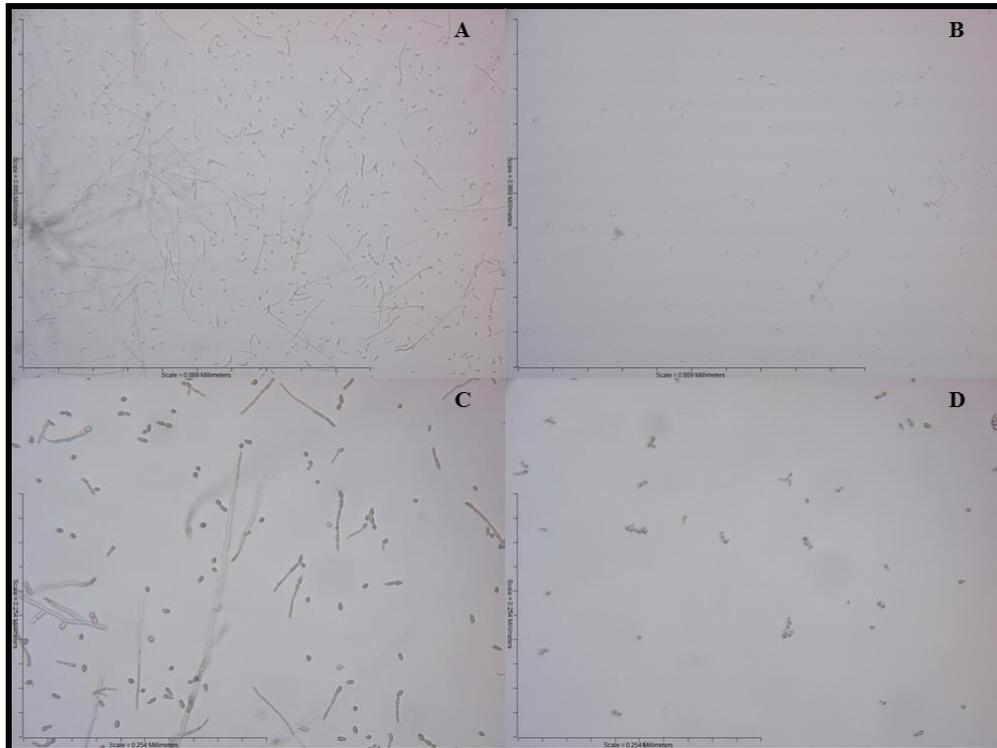
clínico com elevada tendência de desenvolver resistência a diversas drogas antifúngicas (PIERCE et al., 2015). Destacam-se os resultados obtidos para o isolado 6191 (CIM<sub>90</sub> de 1,95 µg/mL) no qual o extrato livre foi cerca de 64 vezes mais efetivo que o fluconazol (CIM<sub>90</sub> de 125 µg/mL). O extrato incorporado não apresentou atividade contra nenhuma cepa, incluindo a SC5314, Acredita-se que a ME tenha degradado durante o transporte Brasil-Estados Unidos devido à alta temperatura, conseqüentemente perdeu a eficácia como carreador.

Perea et al. (2001) avaliaram os mecanismos moleculares envolvidos na resistência de fármacos em isolados clínicos de *C. albicans* incluindo todos os isolados clínicos utilizados neste estudo, com exceção das cepas 6482 e 6191. O estudo envolveu pacientes imunossuprimidos com HIV que estavam sendo tratados com fluconazol e a resistência foi avaliada através do monitoramento de genes envolvidos com a lanosterol 14 $\alpha$ -demetilase (*ERG11*) e transportadores de efluxo (MDR1 e CDR).

Foi realizada também a análise microscópica das cepas padrão de *C. albicans* SC5314 e *C. glabrata* ATCC 2001 crescidas na presença (em concentrações CIM<sub>90</sub>) ou ausência do extrato livre após 24 e 48 horas de crescimento (Figuras 44 a 47), que foi realizada em microscópio ótico invertido e, confirmada a atividade antifúngica do extrato livre contra essas cepas. Uma importante observação a ser notada é que o extrato livre também foi capaz de inibir a filamentação de *C. albicans* (Figura 45 B e D), quando comparado com as cepas crescidas na ausência de tratamento (não tratado como apresentado na Figura 45 A e C).

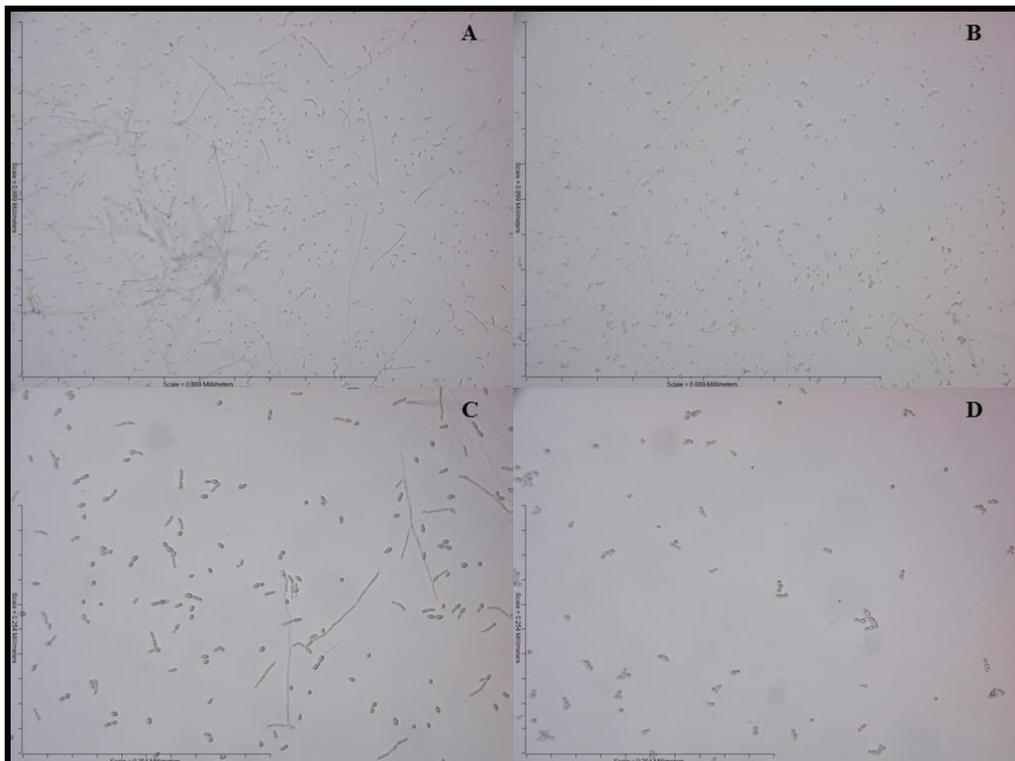
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Figura 44.** Análise microscópica de *C. albicans* não tratada (A e C) ou tratada (B e D) com o extrato livre na concentração de CIM<sub>90</sub> (250 µg/mL) após 24 horas em aumento de 10 (A/B) e 40 (C/D) x, respectivamente.



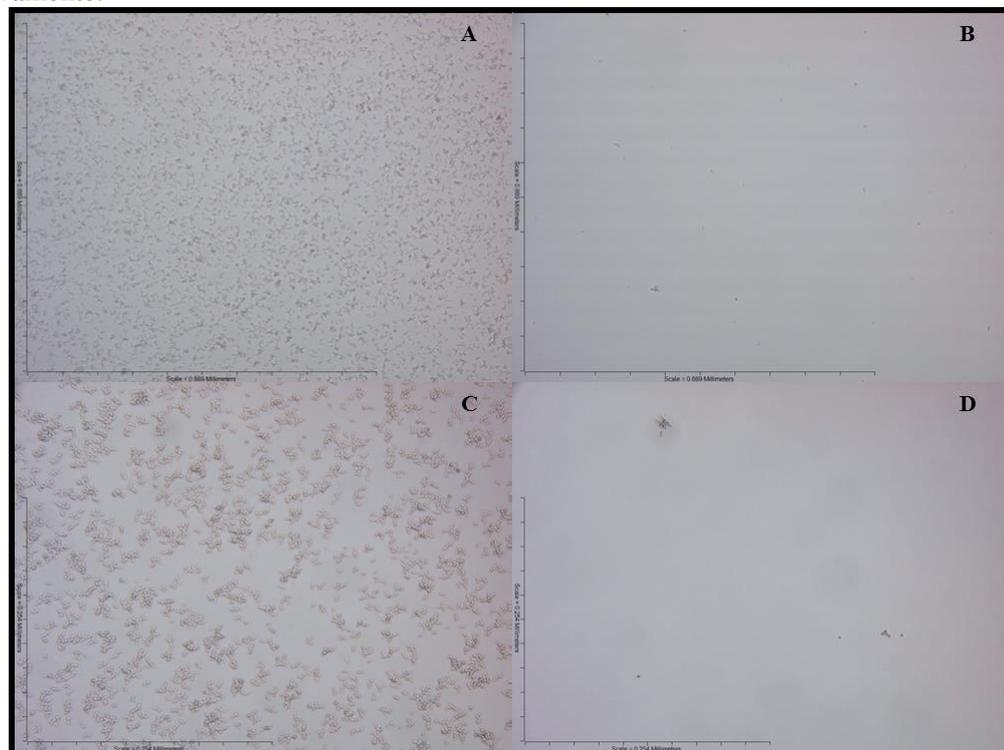
Fonte: Autora.

**Figura 45.** Análise microscópica de *C. albicans* não tratada (A e C) ou tratada (B e D) com o extrato livre na concentração de CIM<sub>90</sub> (250 µg/mL) após 48 horas em aumento de 10 (A/B) e 40 (C/D) x, respectivamente.



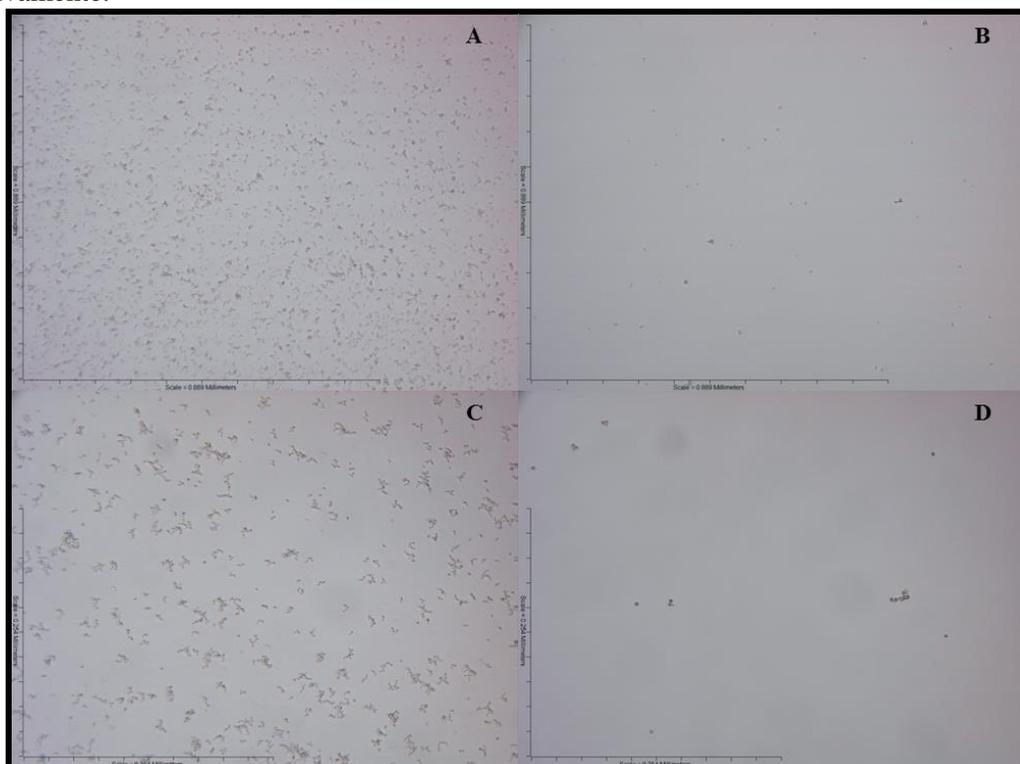
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Figura 46.** Análise microscópica de *C. glabrata* não tratada (A e C) ou tratada (B e D) com o extrato livre na concentração de CIM<sub>90</sub> (31.25 µg/mL) após 24 horas em aumento de 10 (A/B) e 40 (C/D) x, respectivamente.



Fonte: Autora.

**Figura 47.** Análise microscópica de *C. glabrata* não tratada (A e C) ou tratada (B e D) com o extrato livre na concentração de CIM<sub>90</sub> (31.25 µg/mL) após 48 horas em aumento de 10 (A/B) e 40 (C/D) x, respectivamente.



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade antifúngica das amostras também foi avaliada frente a isolados clínicos de *C. albicans* que apresentam mecanismos moleculares de resistência a azólicos previamente caracterizados: TW2, TW3 e TW17, os quais representam isolados com diferentes graus de resistência vindos de um único paciente com candidíase orofaríngea (WHITE, 1997). Além disso, também foram utilizadas três cepas geneticamente modificadas com mutações de ganho de função nos genes que codificam os fatores de transcrição *TAC1*, *MRR1* e *UPC2*, conferindo resistência aos azóis (Tabela 23).

**Tabela 23.** Efeito inibitório ( $\mu\text{g/mL}$ ) do galato de etila, extrato livre e incorporado, e padrão antifúngico fluconazol em isolados clínicos TW e mutantes de cepas ganhadoras de função de *C. albicans*.

| Amostra<br>Cepa | Galato de etila   |                   | Extrato livre     |                   | Extrato+MEA       |                   | Fluconazol        |                   |
|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                 | CIM <sub>50</sub> | CIM <sub>90</sub> |
| TW2             | 500               | -                 | 62,5              | 125-250           | -                 | -                 | <1                | 4-16              |
| TW3             | 500               | -                 | 62,5              | 250               | -                 | -                 | <1                | 62,5-125          |
| TW17            | 250               | -                 | 125               | 250               | -                 | -                 | 31,25-62,5        | 500               |
| TAC1            | -                 | -                 | 125               | 500               | -                 | -                 | 2-4               | 250-500           |
| MRR1            | -                 | -                 | -                 | -                 | -                 | -                 | -                 | -                 |
| UPC2            | 500               | -                 | 15,62             | 500               | -                 | -                 | 1                 | 62,5-125          |
| SC5314          | 500               | -                 | 31,25 -62,5       | 250               | -                 | -                 | 0,25              | 1-2               |

(-) maior que 500  $\mu\text{g/mL}$

Como mostrado na Tabela 23, o padrão de galato de etila também não mostrou atividade contra os mutantes de *C. albicans* (CIM<sub>90</sub> maior que 500  $\mu\text{g/mL}$ ). O extrato livre demonstrou atividade contra todas as cepas de *C. albicans*, com exceção para a cepa *MRR1* (CIM<sub>90</sub> maior que 500  $\mu\text{g/mL}$ ), indicando provavelmente uma superexpressão do principal transportador Mdr1p, que pode ter ocasionado uma susceptibilidade reduzida do extrato livre.

O extrato livre apresentou a mesma atividade antifúngica (CIM<sub>90</sub> de 125-250  $\mu\text{g/mL}$ ) contra todas as cepas isogênicas TW, o que é muito interessante uma vez que apresentam diferentes níveis de resistência aos azóis. Tais cepas foram coletadas do mesmo paciente com candidíase orofaríngea durante o período de tratamento com fluconazol, sendo que a cepa TW1 é considerada a mais suscetível e, a cepa TW17, a mais resistente (WHITE, 1997). O extrato incorporado não apresentou atividade nas concentrações testadas (CIM<sub>90</sub> maior do que 500  $\mu\text{g/mL}$ ).

Hoehamer et al. (2009) estudaram o fator de transcrição Upc2P em isolados clínicos de *C. albicans* que superexpressam *ERG11* e compararam a cepa susceptível. Upc2P é considerado um importante fator de transcrição associada à expressão de *ERG11*, responsável pela biossíntese de ergosterol na levedura. O fluconazol, considerada a droga antifúngica mais comumente utilizada para tratar essas infecções, se liga a essa enzima e previne a síntese de ergosterol.

Outro importante fator de transcrição é o *MRR1* que é envolvido no controle de *MDR1*, um gene resistência multidroga, enquanto que o *TAC1* controla a expressão de genes *CDR* pertencentes a diferentes tipos de bombas de efluxo, como os transportadores ABC. Lohberger et al. (2014) avaliou as diferentes abordagens desses 3 fatores de transcrição (*TAC1*, *MRR1* e *UPC2*) na virulência da levedura *C. albicans*. Neste estudo, os autores estudaram o efeito da virulência das mutações ganhadoras de função em cepas de *C. albicans* geneticamente idênticas, nas quais foram introduzidos diferentes alelos hiperativos. Os resultados mostraram que desses fatores de transcrição envolvidos na resistência aos azóis, a presença de alelos hiperativos *UPC2* apresentou o efeito negativo mais significativo na virulência de *C. albicans*. Morio e co-autores (2013) também avaliaram e confirmaram através de bases moleculares que os fatores de transcrição *TAC1*, *MRR1* e *UPC2* estão frequentemente envolvidos na resistência ao fluconazol após períodos de exposição prolongada a este fármaco.

A Tabela 24 apresenta os resultados referentes à atividade antifúngica do galato de etila, extrato livre e incorporado e padrões antifúngicos fluconazol e equinocandina contra isolados clínicos de *C. glabrata*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Tabela 24.** Efeito inibitório ( $\mu\text{g/mL}$ ) do galato de etila, extrato livre e incorporado e padrões antifúngicos fluconazol e equinocandina contra isolados clínicos de *C. glabrata*.

| Amostra<br>Cepa         | Galato de etila   |                   | Extrato livre     |                   | Extrato+MEA       |                   | F ou E            |                   |
|-------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                         | CIM <sub>50</sub> | CIM <sub>90</sub> |
| CgSM1<br>(sens.a F)     | 1,95              | 15,62             | 0,97              | 1,95              | -                 | -                 | 4-8               | 8                 |
| CgSM3<br>(resist.a F)   | 7,81              | 15,62             | 0,97              | 1,95              | -                 | -                 | 62,5-125          | 125               |
| 14-1829<br>(resist.a F) | 7,81              | 31,25             | <0,97             | 1,95-3,90         | -                 | -                 | >128              | >128              |
| 14-2266<br>(resist.a F) | 7,81              | 15,62-<br>31,25   | <0,97             | 1,95-3,90         | -                 | -                 | 64                | 128               |
| 14-2933<br>(resist.a F) | 7,81-15,62        | 31,25             | <0,97             | 1,95-3,90         | -                 | -                 | >128              | >128              |
| 14-3057<br>(resist.a F) | 15,62             | 31,25             | <0,97             | 1,95-3,90         | -                 | -                 | >128              | >128              |
| 14-3467<br>(resist.a F) | 7,81              | 31,25             | <0,97             | 1,95-3,90         | -                 | -                 | 128               | >128              |
| 05-62<br>(resist.à E)   | 7,81-15,62        | 62,5              | 0,97-1,95         | 3,90-7,81         | -                 | -                 | 4                 | >4                |
| 03-1498<br>(resist.à E) | 7,81-15,62        | 31,25-62,5        | 0,97-1,95         | 3,90-7,81         | -                 | -                 | >4                | >4                |
| 04-1748<br>(resist.à E) | 7,81-15,62        | 31,25             | 0,97-1,95         | 1,95              | -                 | -                 | >4                | >4                |
| 04-2031<br>(resist.à E) | 3,90              | 7,81-15,62        | 0,48-0,97         | 0,97              | -                 | -                 | 2-4               | 4                 |
| 05-416<br>(resist.à E)  | 7,81              | 31,25             | 0,48-0,97         | 1,95              | -                 | -                 | 2-4               | 4                 |
| Cg 2001                 | 31,25             | 62,5              | 1,95              | 31,25             | -                 | -                 | 31,25-<br>62,5(F) | 125 (F)           |

sens.: sensível; resist.: resistente; Cg: *C. glabrata*; F: fluconazol; E: equinocandina

(-) maior que 500  $\mu\text{g/mL}$

Como mostrado na Tabela 24, o padrão de galato de etila mostrou a mesma atividade antifúngica (CIM<sub>90</sub> de 15,62  $\mu\text{g/mL}$ ) contra as cepas de *C. glabrata* que são sensíveis (CgSM1) e resistente (CgSM3) aos azóis. Este resultado se torna muito interessante uma vez

que não houve diferença na atividade mesmo quando testado contra a cepa mais resistente, a qual foi comprovada após ser testada com o controle fluconazol (valores de CIM<sub>90</sub> de 8 e 125 µg/mL contra CgSM1 e CgSM3, respectivamente). Quando avaliado contra as outras cepas consideradas resistentes aos azóis, o padrão de galato de etila também foi mais efetivo em comparação ao fluconazol, uma vez que o controle apresentou valores de CIM maiores do que 128 µg/mL frente todas as cepas, exceto para 14-2266 (CIM<sub>90</sub> de 128 µg/mL), concentração também considerada resistente, uma vez que valores de CIM iguais ou maiores que 64 µg/mL representam resistência a este fármaco, segundo Pham et al. (2014).

As cepas consideradas resistentes a equinocandina foram novamente avaliadas para confirmar tal resistência e mostraram valores de CIM<sub>90</sub> iguais ou maiores que 4 µg/mL, considerados maiores do que aquele que representa resistência a este fármaco (igual ou maior que 0,5 µg/mL) (PHAM et al., 2014). O padrão de galato de etila apresentou atividade antifúngica contra todas as cepas, com destaque para 04-2031 (CIM<sub>90</sub> de 7,81-15,62 µg/mL). Da mesma forma, o extrato livre apresentou boa atividade contra todos os isolados de *C. glabrata* testados, incluindo aqueles resistentes ao fluconazol e/ou caspofungina, com valores de CIM ainda menores que o composto isolado. Os resultados indicam que o galato de etila provavelmente não represente o único componente no extrato responsável pela atividade contra esta espécie de *Candida* sp, o que pode ser confirmado através dos outros sinais encontrados nos espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, além da análise de pureza do pico (74,5 %) da subfração 7.

### 5.19. Atividade contra biofilmes

A Tabela 25 apresenta os resultados obtidos para as amostras contra os biofilmes de *C. albicans* e *C. glabrata*, sob duas diferentes modalidades de tratamento (atividade contra biofilmes pré-formados e inibição contra a formação de biofilme).

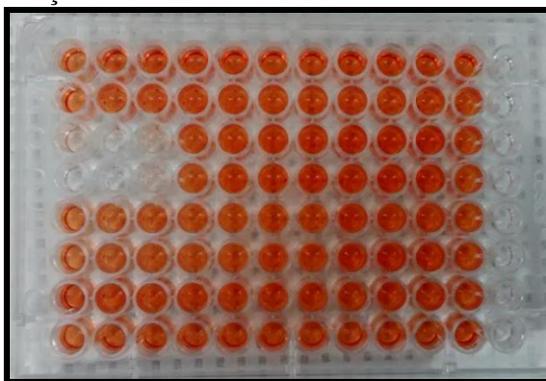
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Tabela 25.** Efeito ( $\mu\text{g/mL}$ ) do galato de etila, extrato livre e incorporado na inibição da formação e em biofilmes pré-formados de *C. albicans* and *C. glabrata*.

| Cepa                            | Amostra<br>Ensaio | Galato de etila   |                   | Extrato livre     |                   | Extrato + ME A    |                   |
|---------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                                 |                   | CIM <sub>50</sub> | CIM <sub>90</sub> | CIM <sub>50</sub> | CIM <sub>90</sub> | CIM <sub>50</sub> | CIM <sub>90</sub> |
| <i>C. albicans</i><br>SC5314    | Pré-formado       | >1000             | >1000             | 1000              | >1000             | >1000             | >1000             |
|                                 | Inibição          | >500              | >500              | 62,5              | 125-250           | >500              | >500              |
| <i>C. glabrata</i><br>ATCC 2001 | Pré-formado       | 1000              | >2000             | 1000              | >2000             | >1000             | >1000             |
|                                 | Inibição          | 500               | >2000             | 250               | 500               | >500              | >500              |

O extrato livre foi capaz de inibir a formação de biofilme de *C. albicans* SC5314 na mesma concentração (CIM<sub>90</sub> de 125-250  $\mu\text{g/mL}$ ) capaz de inibir as células planctônicas, conforme mostrado na Figura 48. Entretanto, os biofilmes pré-formados de *C. albicans* apresentaram maior resistência ao extrato livre (CIM<sub>50</sub> de 1000  $\mu\text{g/mL}$ ). Como esperado, o padrão de galato de etila não apresentou atividade anti-biofilme, uma vez que não apresentou atividade contra as células planctônicas desta espécie de *Candida* sp.

**Figura 48.** Ensaio anti-biofilme revelado com XTT para a levedura *C. albicans* SC5314, onde os poços que permaneceram incolores apresentam ausência de viabilidade celular e, os que alteraram sua coloração para o laranja, presença de viabilidade celular.



Fonte: Autora.

Observações similares foram obtidas para *C. glabrata*, onde o extrato foi mais efetivo para prevenir a formação de biofilme do que para biofilmes pré-formados. Entretanto, o galato de etila apresentou atividade reduzida contra os biofilmes quando comparado contra as células planctônicas de *C. glabrata*.

A maioria dos micro-organismos apresenta a habilidade de se desenvolver na forma de biofilmes, que podem ser definidos como comunidades aderidas a superfícies bióticas ou abióticas e, embebidas dentro de uma matriz polimérica de proteção. Diante dos inúmeros

casos de resistência aos antifúngicos mais clinicamente utilizados, além do fato de que o gênero *Candida* sp representam os principais organismos associados a infecções causadas por biofilmes, decidimos testar a atividade das nossas amostras contra esta estrutura de proteção.

Não existem relatos na literatura que abordam a atividade anti-biofilme do *A. urundeuva* contra espécies de *C. albicans* e *C. glabrata*, mas existem alguns estudos que propõe esta planta como um forte inibidor de biofilmes bacterianos. Gaetti-Jardim Júnior et al. (2011) avaliaram a atividade antimicrobiana de seis plantas brasileiras, incluindo o *A. urundeuva* contra bactérias periodontais: *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, *Prevotella intermedia* ATCC 2564, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 33384, além de dez isolados clínicos de *P. gingivalis* e dez *F. nucleatum* de pacientes com periodontite crônica. Além de avaliar a CIM, foram realizados ensaio anti-biofilme contra a bactéria *F. nucleatum* devido a sua habilidade em se aderir a superfícies de poliestireno. Os resultados mostraram que dentre os extratos de plantas testadas, o extrato aquoso e etanólico do *A. urundeuva* apresentou boa atividade antibacteriana tanto em células planctônicas quanto em biofilmes.

Trentin et al. (2013) avaliaram a atividade antibacteriana dos taninos presentes de determinadas plantas medicinais, entre elas o *A. urundeuva*. Dentre os ensaios biológicos realizados, os autores investigaram a eficácia dos taninos encontrados contra a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* e concluíram dentre os 45 extratos de plantas estudadas, os melhores resultados foram obtidos do *A. urundeuva*. Os autores acreditam que essa classe de substâncias são capazes de inibir a formação de biofilmes através do dano causado a membrana bacteriana e além de dificultar a produção da matrix exopolimérica.

### **5.20. Estudos de combinação da amostra vegetal com os antifúngicos convencionais**

As Tabelas 26 e 27 mostram os resultados obtidos para a combinação das amostras com as drogas convencionais (anfotericina B, fluconazol e equinocandina) contra *C. albicans* SC5314 e *C. glabrata* ATCC 2001 (os valores de ICIF estão apresentados entre parênteses). As Figuras 49-52 representam o mapa de cores dos resultados referentes ao ensaio *checkerboard* para avaliar a eficácia de algumas combinações, com cores variando desde o azul claro (baixa inibição) até o azul escuro (alta inibição).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Tabela 26.** Efeito inibitório do galato de etila, extrato livre e incorporado em combinação com a anfotericina B, fluconazol e equinocandina em *C. albicans* SC5314. Números dados em parênteses indicam ICIF para combinações que representam sinergismo.

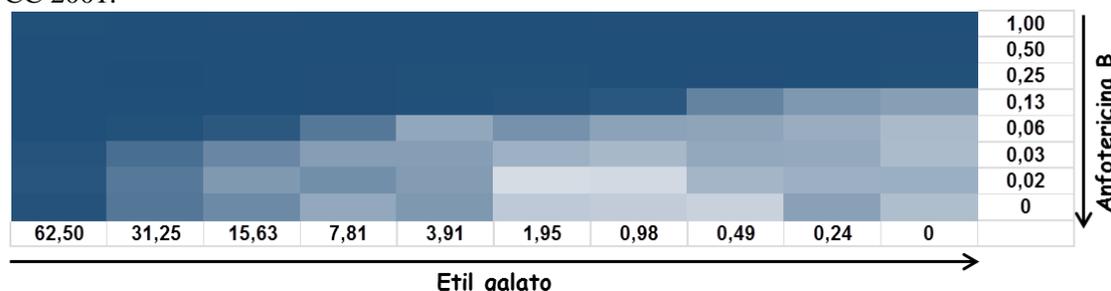
| Amostra             | Fármaco           |                   |              |
|---------------------|-------------------|-------------------|--------------|
|                     | Anfotericina B    | Fluconazol        | Caspofungina |
| Galato de etila     | Indiferença       | Indiferença       | Indiferença  |
| Extrato livre       | Sinergismo (0,28) | Sinergismo (0,14) | Indiferença  |
| Extrato incorporado | Indiferença       | Indiferença       | Indiferença  |

**Tabela 27.** Efeito inibitório do galato de etila, extrato livre e incorporado em combinação com a anfotericina B, fluconazol e equinocandina em *C. glabrata* ATCC 2001. Números dados em parênteses indicam ICIF para combinações que representam sinergismo.

| Amostra             | Fármaco           |                   |              |
|---------------------|-------------------|-------------------|--------------|
|                     | Anfotericina B    | Fluconazol        | Caspofungina |
| Galato de etila     | Sinergismo (0,26) | Indiferença       | Indiferença  |
| Extrato livre       | Indiferença       | Sinergismo (0,05) | Indiferença  |
| Extrato incorporado | Indiferença       | Indiferença       | Indiferença  |

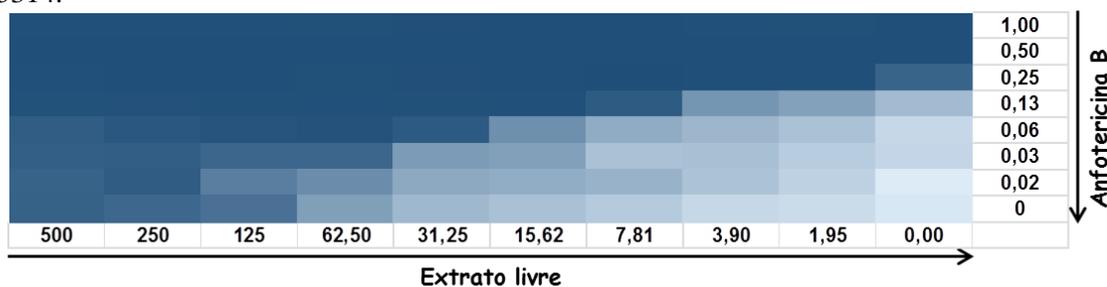
O padrão de galato de etila não apresentou atividade contra *C. albicans* mesmo em combinação com anfotericina B, fluconazol e caspofungina, mas em combinação com anfotericina B apresentou sinergismo quando avaliado contra *C. glabrata* (Figura 49). Destacam-se os resultados obtidos do extrato livre em combinação com anfotericina B contra *C. albicans* (Figura 50) e em combinação com fluconazol contra as duas cepas de *Candida* (Figuras 51 e 52), uma vez que foram calculados valores de ICIF menores que 0,5, indicando sinergismo. O extrato incorporado não apresentou atividade tanto contra *C. albicans* como *C. glabrata* mesmo em combinação com outros antifúngicos.

**Figura 49.** Mapa de cores do galato de etila em combinação com anfotericina B em *Candida glabrata* ATCC 2001.



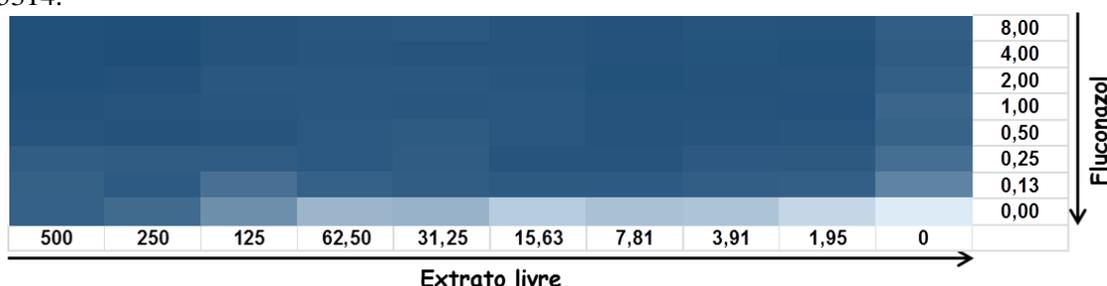
Fonte: Autora.

**Figura 50.** Mapa de cores do extrato livre em combinação com a anfotericina B em *Candida albicans* SC5314.



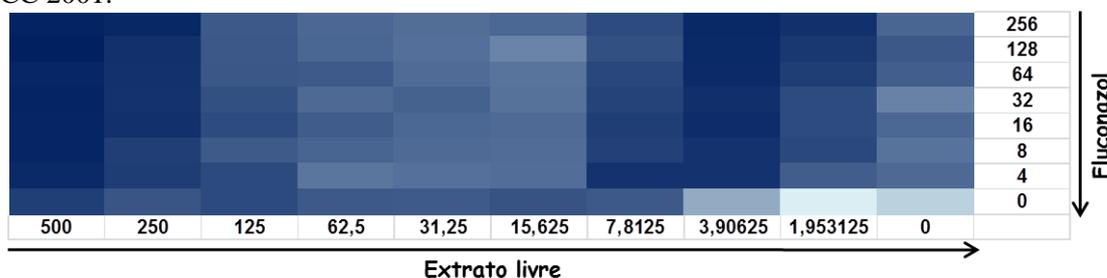
Fonte: Autora.

**Figura 51.** Mapa de cores do extrato livre em combinação com fluconazole em *Candida albicans* SC5314.



Fonte: Autora.

**Figura 52.** Mapa de cores do extrato livre em combinação com fluconazol em *Candida glabrata* ATCC 2001.



Fonte: Autora.

Acredita-se que as combinações entre o fluconazol e o extrato livre ou até mesmo o padrão de galato de etila poderia representar novas alternativas promissoras para combater infecções causadas por *C. albicans* ou *C. glabrata*, em particular aquelas resistentes aos tratamentos antifúngicos convencionais.

Não foram encontrados estudos na literatura que avaliem a combinação entre o extrato de *A. urundeuva* em combinação com os antifúngicos mais convencionalmente utilizados direcionados para a atividade antifúngica contra cepas de *Candida* sp., destacando mais uma vez a significância e inovação de nossos resultados.

**5.21. Análise do potencial do desenvolvimento de resistência**

Como já mencionado anteriormente, este ensaio foi iniciado com uma concentração correspondente a metade da CIM<sub>50</sub> na primeira semana (Tabela 28). A partir da segunda semana, as cepas foram expostas ao CIM<sub>50</sub> e esta concentração foi mantida até o final do experimento.

**Tabela 28.** Concentrações (µg/mL) estabelecidas para o extrato livre e fluconazol frente às cepas de *C.albicans* SC5314 e *C. glabrata* ATCC 2001 utilizadas no ensaio de desenvolvimento da resistência.

| Cepa    | Extrato livre     |                          |                             | Fluconazol        |                          |                             |
|---------|-------------------|--------------------------|-----------------------------|-------------------|--------------------------|-----------------------------|
|         | CIM <sub>50</sub> | Concentração<br>Semana 1 | Concentração<br>Semanas 2-8 | CIM <sub>50</sub> | Concentração<br>Semana 1 | Concentração<br>Semanas 2-8 |
| Ca 5314 | 31,25             | 15,62                    | 31,25                       | 0,25              | 0,125                    | 0,25                        |
| Cg 2001 | 1,95              | 0,97                     | 1,95                        | 32                | 16                       | 32                          |

Ca: *C. albicans*; Cg: *C. glabrata*

Os resultados mostraram que as duas espécies testadas, tanto *C. albicans* quanto *C. glabrata*, não desenvolveram resistência ao extrato livre mesmo após serem expostas repetidamente durante todo o experimento, onde os valores de CIM<sub>90</sub> foram mantidos em 250 e 31,25 µg/mL, respectivamente, da 1<sup>a</sup> a 8<sup>a</sup> semana. O mesmo não pode ser observado após exposição das cepas ao fluconazol, já que as ambas as espécies desenvolveram resistência ao apresentarem valores de CIM maior que 128 µg/mL logo após a 3<sup>a</sup> (*C. albicans*) e 4<sup>a</sup> semana (*C. glabrata*) de exposição.

O experimento de passagem seriada (*serial passage*) permite simular uma possível alteração no grau de susceptibilidade de determinada cepa quando exposta a determinado ativo por um certo período de tempo. Este ensaio é considerado de extrema importância, uma vez que uma série de tratamentos antifúngicos demandam a exposição ao fármaco utilizado por um período de tempo relativamente longo, o que facilitaria o desenvolvimento da resistência da cepa causadora de infecção (PIERCE et al., 2015). Caso tivesse sido detectado algum tipo de resistência desenvolvido pelas cepas de *Candida* sp. novos estudos poderiam ser utilizados para investigar o tipo de resistência desenvolvida. Os resultados obtidos mostram-se muito promissores uma vez que o surgimento de cepas cada vez mais resistentes aos fármacos convencionais dificulta ainda mais o sucesso no tratamento antifúngico.

**5.22. Eficácia contra cepas de *Cryptococcus* sp**

A Tabela 29 mostra os resultados obtidos para o galato de etila, extrato livre e incorporado contra cepas de *C. neoformans* e *C. gattii*.

**Tabela 29.** Efeito inibitório ( $\mu\text{g/mL}$ ) do galato de etila, extrato livre e incorporado contra *Cryptococcus neoformans* (H99, WSA and R4247) e *Cryptococcus gattii* (R265).

| Cepa                       | Amostra | Galato de etila   |                   | Extrato livre     |                   | Extrato + ME A    |                   |
|----------------------------|---------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                            |         | CIM <sub>50</sub> | CIM <sub>90</sub> | CIM <sub>50</sub> | CIM <sub>90</sub> | CIM <sub>50</sub> | CIM <sub>90</sub> |
| <i>C. neoformans</i> H99   |         | -                 | -                 | -                 | -                 | -                 | -                 |
| <i>C. neoformans</i> WSA   |         | -                 | -                 | 0,97              | 1,95              | -                 | -                 |
| <i>C. gattii</i> R265      |         | 500               | -                 | 15,62             | 31,25             | -                 | -                 |
| <i>C. neoformans</i> R4247 |         | -                 | -                 | 1,95              | 3,90              | -                 | -                 |

(-) maior que 500  $\mu\text{g/mL}$

O extrato livre foi o único que apresentou atividade contra as cepas de *Cryptococcus* sp, com exceção para a espécie de *C. neoformans* H99. O *C. neoformans* H99 (sorotipo A, Mat  $\alpha$ ) é considerado uma das cepas mais estudadas do gênero. A cepa WSA também é considerada um sorotipo da espécie *C. neoformans* e foi considerada a cepa mais sensível dentre os resultados obtidos uma vez que o extrato livre exibiu o menor valor de CIM<sub>90</sub> (1,95  $\mu\text{g/mL}$ ). A cepa R4247 (espécie *C. neoformans* - sorotipo D) também se mostrou sensível quando exposta ao extrato livre (CIM<sub>90</sub> de 3,90  $\mu\text{g/mL}$ ).

Já em relação à cepa R265, que representa a espécie *C. gattii*, é considerada um membro do genótipo VGIIa mais virulento. Os resultados mostraram que o extrato livre apresentou valor de CIM<sub>90</sub> de 31,25  $\mu\text{g/mL}$  contra esta espécie, a qual foi considerada a cepa mais resistente para esta amostra. Assim como para as espécies de *Candida* sp. o extrato incorporado não apresentou-se efetivo contra as espécies de *Cryptococcus* testadas, bem como o padrão comercial de galato de etila.

Não existem estudos na literatura que reportem a atividade antifúngica do extrato de *A. urundeuva* contra cepas de *Cryptococcus*, a qual destaca a significância dos resultados apresentados neste estudo.

**5.23. Espectro de ação contra múltiplas espécies fúngicas**

Por apresentar uma melhor atividade contra as espécies de *Candida* sp. testadas, o extrato livre foi selecionado para ser avaliado contra outras espécies deste mesmo gênero, além de fungos filamentosos. Os resultados referentes ao ensaio contra múltiplas espécies fúngicas estão sumarizados na Tabela 30.

**Tabela 30.** Concentração do extrato livre ( $\mu\text{g/mL}$ ) contra múltiplas espécies fúngicas para inibir 50% e 100% viabilidade celular.

| Espécie                   | Isolado    | Extrato livre |       | Flu          | Vor   | Pos  | Cas  |
|---------------------------|------------|---------------|-------|--------------|-------|------|------|
|                           |            | 50%           | 100%  | 50%          | 100%  | 100% | 50%  |
| <i>C. parapsilosis</i> QC | ATCC 22019 | 1             | 4     | 0,5          | -     | -    | -    |
| <i>C. krusei</i> QC       | ATCC 6258  | 1             | 4     | 16           | -     | -    | -    |
| <i>C. albicans</i>        | ATCC 90028 | 2             | 4     | $\leq 0,125$ | -     | -    | -    |
|                           | SC5314     | 4             | 8     | $\leq 0,125$ | -     | -    | -    |
|                           | 14-62      | 4             | 8     | $>64$        | -     | -    | -    |
| <i>C. glabrata</i>        | 14-1829    | 0,25          | 2     | -            | -     | -    | 1    |
|                           | 14-2266    | 0,25          | 2     | -            | -     | -    | 0,25 |
|                           | 14-2933    | 0,125         | 2     | -            | -     | -    | 0,25 |
| <i>C. neoformans</i>      | 15-3050    | 4             | $>32$ | 8            | -     | -    | -    |
|                           | 15-1254    | 2             | $>32$ | 32           | -     | -    | -    |
|                           | 14-2766    | 2             | 32    | 32           | -     | -    | -    |
| <i>R. arrhizus</i>        | 14-619     | 8             | $>32$ | -            | -     | 0,5  | -    |
|                           | 15-3715    | 8             | $>32$ | -            | -     | 0,25 | -    |
| <i>A. fumigatus</i>       | AF293      | $>32$         | $>32$ | -            | 0,5   | -    | -    |
|                           | 14-1771    | $>32$         | $>32$ | -            | 2     | -    | -    |
|                           | 14-3728    | $>32$         | 32    | -            | 0,25  | -    | -    |
| <i>Fusarium</i> sp.       | 15-2281    | $>32$         | $>32$ | -            | 4     | -    | -    |
|                           | 15-3163    | $>32$         | $>32$ | -            | 4     | -    | -    |
|                           | 15-3499    | $>32$         | $>32$ | -            | $>16$ | -    | -    |
| <i>Scedosporium</i> sp.   | 15-829     | $>32$         | $>32$ | -            | 2     | -    | -    |
|                           | 15-957     | $>32$         | $>32$ | -            | 1     | -    | -    |
|                           | 13-1000    | $>32$         | $>32$ | -            | $>16$ | -    | -    |
|                           | 14-3780    | $>32$         | $>32$ | -            | $>16$ | -    | -    |
|                           | 15-106     | $>32$         | $>32$ | -            | $>16$ | -    | -    |

(-) sem atividade; Flu: fluconazol; Vor: voriconazol; Pos: posaconazol; Cas: caspofungina

Ao analisar os resultados, pode-se observar que para as espécies de *Candida* sp., o extrato apresentou-se bastante promissor, ao exibir valores de CIM ainda inferiores aos valores que já havia apresentado nos ensaios anteriores, como por exemplo para a espécie *C. albicans* SC5314, na qual o extrato havia apresentado um valor de CIM<sub>90</sub> de 31,25 µg/mL e foi capaz de inibir 100% do crescimento desta mesma espécie com uma concentração de 8 µg/mL. Nesta mesma concentração o extrato foi capaz de inibir 100% do crescimento de outra espécie de *C. albicans* (14-62), além de também inibir o crescimento da espécie ATCC 90028 em uma concentração ainda menor (4 µg/mL).

Além desta espécie, o extrato livre também foi capaz de inibir o 100% do crescimento das espécies de *C. parapsilosis* QC e *C. krusei* na concentração de 4 µg/mL. Destacam-se os resultados obtidos para *C. glabrata* onde o extrato livre foi capaz de inibir 100% do seu crescimento na concentração de 2 µg/mL frente a todos os isolados desta espécie, o que confirma os resultados que haviam sido obtidos ao mostrar que o extrato demonstra melhor atividade contra a espécie de *C. glabrata* do que para *C. albicans*.

Os resultados mostraram moderada atividade do extrato para os isolados de *C. neoformans*, o qual apresentou efeito inibitório de 50% do crescimento com concentrações entre 2-4 µg/mL, mas maior que 32 µg/mL para ser capaz de inibir 100%, com exceção para o isolado 14-2766 ao apresentar-se 100% sensível quando exposto a concentração de 32 µg/mL do extrato. Em relação aos fungos filamentosos, o extrato não demonstrou atividade, com exceção para *Rhizopus arrhizus*, no qual apresentou efeito inibitório de 50% contra os dois isolados testados na concentração de 8 µg/mL.

Alves et al. (2008) estudaram a atividade antimicrobiana de determinadas plantas medicinais brasileiras, incluindo a planta estudada neste estudo, contra micro-organismos comumente envolvidos nos quadros de candidose bucal. Dentre as plantas medicinais estudadas, o *A. urundeuva* apresentou atividade antifúngica contra as três espécies de *Candida* sp avaliadas: *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, com valores de CIM de 8, 16 e 16 mg/mL, respectivamente, o que comprova os resultados apresentados em neste estudo, os quais apresentaram ainda mais atividade contra estas espécies uma vez que apresentaram valores de CIM inferiores ao encontrado por Alves.

Sá et al. (2009) investigaram algumas propriedades biológicas apresentadas por metabólitos secundários do caule de *A. urundeuva*, dentre elas a atividade antifúngica. Os

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

autores observaram que tanto o extrato salina quanto o metanólico desta planta medicinal apresentaram atividade contra diversas espécies de *Fusarium* sp.

Não são reportados na literatura estudos que avaliem a atividade antifúngica do *A. urundeuva* contra as espécies fúngicas *R. arrhizus*, *A. fumigatus* e *Scedosporium* sp.

## 6. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- ✓ As substâncias ácido gálico, galato de metila e galato de etila foram identificadas no extrato das folhas de *A. urundeuva*;
- ✓ A substância PGG, inicialmente identificada no extrato em outro estudo, não foi mais encontrada quando o mesmo foi analisado novamente após um determinado período de tempo, indicando que esta provavelmente foi degradada;
- ✓ Não é possível afirmar se a presença das substâncias galato de metila e galato de etila no extrato pode ser consequência do processo de degradação (metanólise e etanólise, respectivamente) a partir do PGG, ou se podem ser consideradas um metabólito secundário da planta;
- ✓ Pode-se verificar que as substâncias galato de metila e galato de etila são as responsáveis por grande parte da atividade antifúngica do extrato contra a espécie *C. glabrata*, mas que ainda assim, existe a ação sinérgica de outros componentes do extrato que permitem uma maior atividade antifúngica, uma vez que este apresentou um menor valor de CIM;
- ✓ A atividade antifúngica contra a espécie *C. albicans* se dá provavelmente devido a um sinergismo entre as substâncias identificadas com outras substâncias minoritárias não identificadas no extrato, ou até mesmo devido a estas substâncias não identificadas;
- ✓ A quantificação das substâncias identificadas no extrato mostrou que o extrato encontra-se em processo de degradação uma vez que foi observado redução do teor das substâncias identificadas em relação ao estudo anterior realizado por Perez (2012). Ainda assim, a substância galato de etila foi identificada como a de maior teor no extrato;
- ✓ O ensaio de combinação através do método *Checkerboard* entre as substâncias identificadas confirmou a importância dos componentes minoritários para a atividade contra as espécies *Candida* sp., principalmente para a espécie *C. albicans* já que nem a combinação das substâncias identificadas entre si foi capaz de ser efetiva contra esta espécie;
- ✓ Apesar de o extrato incorporado na ME ter apresentado um mesmo valor de CIM na determinação da atividade antifúngica, este foi capaz de apresentar um efeito fungicida na mesma concentração apresentada, enquanto que o extrato livre mostrou um efeito fungistático nesta mesma concentração;
- ✓ Os ensaios *in vitro* de citotoxicidade mostraram que o extrato não se apresenta citotóxico para as linhagens VERO e MRC5, apresentando-se ainda mais seletivo para as células de interesse

principalmente após a incorporação (linhagem VERO). O mesmo não foi observado para a linhagem HaCaT, na qual o extrato além de apresentar-se citotóxico, mostrou-se menos seletivo para as células de interesse após a incorporação;

- ✓ O ensaio de citotoxicidade utilizando o modelo alternativo de *Artemia salina* L. mostrou resultados bastante promissores para o extrato livre e incorporado ao garantir 100% da viabilidade dos náuplios mesmo quando expostos a maior concentração. Tal viabilidade foi um pouco reduzida quando os mesmos foram tratados com o padrão de ácido gálico. Para o padrão de galato de metila, o grau de toxicidade foi aumentado e, ainda mais para o galato de etila, quando utilizados na maior concentração;
- ✓ No ensaio *in vivo* de CVV, os animais tratados com o extrato incorporado nas MEs A e B foram curados mais rapidamente em relação os tratados apenas com o extrato livre e com o controle positivo (anfotericina B), sendo que adição do Poloxamer<sup>®</sup> 407 na ME B na concentração utilizada (0,5 %) não apresentou diferença significativa na redução da carga fúngica dos animais em relação aos tratados com a ME sem poloxamer (ME A). Além disso, os animais tratados com o extrato incorporado nas MEs A e B foram os únicos que permaneceram curados até o final do período de recidiva;
- ✓ O extrato livre apresentou forte atividade *in vitro* contra os isolados clínicos de *C. albicans* e *C. glabrata*, mesmo contra aquelas consideradas resistentes aos fármacos mais comumente utilizados no tratamento, como fluconazol, anfotericina B e caspofungina;
- ✓ O ensaio de combinação entre o extrato e os fármacos convencionalmente utilizados mostrou ação sinérgica quando o extrato foi combinado com anfotericina e fluconazol para *C. albicans* e com fluconazol para *C. glabrata*. Além disso, o efeito sinérgico também foi observado quando o padrão de galato de etila foi combinado com anfotericina para *C. glabrata*;
- ✓ O extrato livre foi capaz de inibir a formação de biofilme de *C. albicans* na mesma concentração utilizada para as células planctônicas, porém necessitou de uma maior concentração para inibir o biofilme de *C. glabrata*. Em contrapartida, o extrato não foi efetivo em biofilmes pré-formados das duas espécies de *Candida* sp.;
- ✓ O ensaio de desenvolvimento de resistência mostrou que em contraste ao fluconazol, no qual foi observado desenvolvimento de resistência durante a exposição, as cepas não se tornaram resistentes após serem expostas ao extrato livre ao manterem seus valores de CIM do início ao fim do experimento;

- ✓ Além de apresentar atividade antifúngica contra as espécies de *Candida* sp, o extrato livre também mostrou-se promissor contra as cepas de *C. neoformans* (WSA e R4247) e *C. gattii* R265 ao apresentar valores de CIM significativos;
- ✓ Ao contrário do ocorrido para as leveduras, o extrato não demonstrou atividade para fungos filamentosos, exceto para *Rhizopus arrhizus*, confirmando sua maior seletividade para as leveduras, principalmente para as espécies de *Candida* sp.

De uma maneira geral, pode-se concluir que o extrato das folhas de *A urundeuva* apresenta-se extremamente promissor como uma fonte alternativa de tratamento para a candidíase uma vez que necessita de concentrações extremamente baixas para ser efetivo contra as cepas de *Candida* sp, incluindo até mesmo isolados clínicos resistentes aos fármacos convencionais, além de mostrar-se seletivo para as células de interesse, o que poderia apresentar redução significativa dos efeitos colaterais.

## REFERÊNCIAS

ACHKAR, J. M.; FRIES, B. C. *Candida* infections of the genitourinary tract. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 2, p. 253-273, 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. SUS financia seis novos fitoterápicos. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id\\_area=124&CO\\_NOTICIA=10896](http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id_area=124&CO_NOTICIA=10896)>. Data de Publicação: 2 de dezembro de 2009. Acesso: 03 fev. 2012.

AKTHAR, M. S.; DEGAGA, B.; AZAM, T. Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: a review. **Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research**, v. 2, n. 1, p. 1-7, 2014.

ALEXANDER, B. D.; JOHNSON, M. D.; PFEIFFER, C. D.; JIMÉNEZ-ORTIGOSA, C.; CATANIA, J.; BOOKER, R.; CASTANHEIRA, M.; MESSER, S. A.; PERLIN, D. S.; MICHAEL, A. P. Increasing Echinocandin Resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. **Clinical Infectious Diseases**, v. 56, n. 12, p. 1724-1732, 2013.

AL-SNAFI, A. E. Therapeutic properties of medicinal plants: a review of their antibacterial activity. **International Journal of Pharmacy & Therapeutics**, v. 6, n. 3, p. 137-158, 2015.

ALVES, P. M.; QUEIROZ, L. M. G.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. S. V. Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica in vitro de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 222-224, 2009.

ALVES, C. T.; FERREIRA, I. C. F. R.; BARROS, L.; SILVA, S.; AZEREDO, J.; HENRIQUES, M. Antifungal activity of phenolic compounds identified in flowers from North Eastern Portugal against *Candida* species. **Future Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 139-146, 2014.

ARAÚJO, D.; HENRIQUES, M.; SILVA, S. Portrait of *Candida* species biofilm regulatory network genes. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 62-75, 2017.

ARMSTRONG-JAMES, D.; MEINTJES, G.; BROWN, G. D. A neglected epidemic: fungal infections in HIV/AIDS. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 3, p. 120-127, 2014.

AVERSA, F.; BUSCA, A.; CANDONI, A.; CESARO, S.; GIRMENIA, C.; LUPPI, M.; NOSARI, A. M.; PAGANO, L.; ROMANI, L.; ROSSI, G.; VENDITTI, A.; NOVELLI, A. Liposomal amphotericin B (AmBisome<sup>®</sup>) at beginning of its third decade of clinical use. **Journal of Chemotherapy**, v. 29, n. 3, p. 131-143, 2017.

BADIEE, P.; HASHEMIZADEH, Z. Opportunistic invasive fungal infections: diagnosis & clinical management. **Indian Journal of Medical Research**, v. 139, n. 2, p. 195-204, 2014.

- BARAI, L.; FATEMA, K.; HAQ, J. A.; FARUQ, M. O.; AHSAN, A. A.; MORSHED, M. A. H. G.; HOSSAIN, M. B. Bacterial profile and their antimicrobial resistance pattern in an intensive care unit of a tertiary care hospital in Dhaka. **Ibrahim Medical College Journal**, v. 4, n. 2, p. 66-69, 2010.
- BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. B. G. Candidíase. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 22, n. 1, p. 22-38, 2010.
- BARBOSA, C.; FERNANDES, G.; QUINTAS, C.; ESTER TEIXEIRA, M.; PEDRO NEVES, J. Derivados azólicos no tratamento da candidíase vulvovaginal não complicada. **Acta Obstetrica e Ginecologica Portuguesa**, v. 6, n. 3, p. 118-123, 2012.
- BHARATE, S. S.; BHARATE, S. B.; BAJAJ, A. N. Interactions and incompatibilities of pharmaceutical excipients with active pharmaceutical ingredients: a comprehensive review. **Journal of Excipients and Food Chemicals**, v. 1, n. 3, p. 3-26, 2010.
- BIANCO, K. G.; LANDUCI, L. F.; SCHEWEITZER, C. M.; GAETTI-JARDIM, E. C. Influence of subinhibitory concentrations of extracts from *Psidium cattleianum* (Sabine) and *Myracrodruon urundeuva* (Allemao) on mutans streptococci adhesion to glass and enamel surfaces. **Archives of Health Investigation**, v. 6, n. 3, p. 136-140, 2017.
- BIBI, Y.; NISA, S.; CHAUDHARY, F. M.; ZIA, M. Antibacterial activity of some selected medicinal plants of Pakistan. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, p. 52-58, 2011.
- BOATTO, H. F.; GIRÃO, M. J. B. C.; FRANCISCO, E. C.; MACHADO, A. P.; MORAES, M. S.; FISCHMAN, O. Susceptibility to fluconazole and ketoconazole of *Candida* spp. isolated from primary and episodic vulvovaginites by E-Test (São Paulo, SP, Brazil). **Open Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 6, n. 12, p. 689-697, 2016.
- BOECKEL, D. G. **Ensaio de citotoxicidade do Ácido hialurônico como veículo no composto celular autógeno para enxertia óssea**. 2011. 72f. Dissertação (Mestrado Prótese Dentária) - Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Porto Alegre, 2011.
- BONIFÁCIO, B. V.; SILVA, P. B.; RAMOS, M. A. S.; NEGRI, K. M. S.; BAUAB, T. M.; CHORILLI, M. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 1-15, 2014.
- BONIFÁCIO, B. V.; RAMOS, M. A. S.; SILVA, P. B.; NEGRI, K. M. S.; LOPES, E. O.; SOUZA, L. P.; VILEGAS, W.; PAVAN, F. R.; CHORILLI, M.; BAUAB, T. M. Nanostructured lipid system as a strategy to improve the anti-*Candida albicans* activity of *Astronium* sp. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, 5081-5092, 2015.
- BOURZAC, K. Nanotechnology: carrying drugs. **Nature**, v. 491, n. 7425, p. S58-60, 2012.
- BOUZA, E.; GUINEA, J.; GUEMBE, M. The role of antifungals against *Candida* biofilm in catheter-related candidemia. **Antibiotics**, v. 4, n. 1, p. 1-17, 2015.

- BRESOLIN, T.M.B.; FILHO, V.C. **Fármacos e Medicamentos**: uma abordagem multidisciplinar. São Paulo: Santos, 2010. 436 p.
- BROWN, G. D.; DENNING, D. W.; GOW, N. A. R.; LEVITZ, S. M.; NETEA, M. G.; WHITE, T. C. Hidden killers: human fungal infections. **Medical Mycology**, v. 4, n. 165, p. 165rv13, 2012.
- CARLINI, E. A.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; RODRIGUES, E.; TABACH, R. Antiulcer effect of the pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-da-praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão, Anacardiaceae (aroeira-do-sertão). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 140-146, 2010.
- CARTAXO, S. L.; SOUZA, M. M. A.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brasil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, p. 326-342, 2010.
- CARVALHO, A. G. **Isolamento e identificação de compostos fenólicos em folhas de *Eugenia uniflora* L.** 2013.44 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química, Goiânia, 2013.
- CASTAÑEDA, D. M.; POMBO, L. M.; URUEÑA, C. P.; HERNANDEZ, J. F.; FIORENTINO, S. A gallotannin-rich fraction from *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze displays cytotoxic activity and raises sensitivity to doxorubicin in a leukemia cell line. **BMC Complementary & Alternative Medicines**, v. 12, n. 38, doi: 10.1186/1472-6882-12-38, 2012.
- CHAFFIN, W. L.; LÓPEZ-RIBOT, J. L.; CASANOVA, M.; GOZALBO, D.; MARTÍNEZ, J. P. Cell wall and secreted proteins of *C. albicans*: identification, function, and expression. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p.130-180, 1998.
- CLSI. **Manual Clinical and Laboratory Standards Institute**. Reference methods for broth dilution antifungal susceptibility tests for yeasts; approved standards, CLSI document M27-A3, Wayne, PA., 2008.
- CLSI. **Manual Clinical and Laboratory Standards Institute**. Reference methods for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standards, CLSI document M38-A2, Wayne, PA., 2008.
- COHEN, B. E. The role of signaling via aqueous pore formation in resistance responses to amphotericin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 9, p. 5122-5129, 2016.
- COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUÉR, S. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; DA MATTA, D. A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2816-23, 2006.
- COSTA, E. M. M. B.; BARBOSA, A. S.; ARRUDA, T. A.; OLIVEIRA, P. T.; DAMETTO, F. R.; CARVALHO, R. A.; MELO, M. D. Estudo *in vitro* da ação antimicrobiana de extratos

de plantas contra *Enterococcus faecalis*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 3, p. 175-180, 2010.

COSTA, O. B.; DEL MENEZZI, H. S.; BENEDITO, L. E. C.; RESCK, I. S.; VIEIRA, R. F.; BIZZO, H. R. Essential oil constituents and yields from leaves of *Blepharocalyx salicifolius* (Kunt) O. Berg and *Myracrodruon urundeuva* (Allemão) collected during daytime. **International Journal of Forestry Research**, v. 2014, p. 1-6, 2014.

COWEN, L. E.; NANTEL, A.; WHITEWAY, M. S.; THOMAS, D. Y.; TESSIER, D. C.; KOHN, L. M.; ANDERSON, J. B. Population genomics of drug resistance in *Candida albicans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 14, 2002.

CUNHA, F. P.; COSTA, L. J. L.; FERNANDES, A. J. D.; SOUZA, T. P.; SOARES, L. A. L. Development and optimization of extractives from *Astronium urundeuva* (allemão) Engl. by factorial design. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 3, p. 647-652, 2009.

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 174-181, 2012.

DAS, K.; TIWARI, R.K.S.; SHRIVASTAVA, D.K. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 2, p. 104-111, 2010.

DIAZ, M. A. N.; ROSSI, C. C.; MENDONÇA, V. R.; SILVA, D. M.; RIBON, A. O. B.; AGUILAR, A. P.; MUÑOZ, G. D. Screening of medicinal plants for antibacterial activities on *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 724-728, 2010.

DOMINGUEZ, E. G.; ANDES, D. R. ***Candida albicans*: cellular and molecular biology**. Springer International Publishing AG, 2017. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-50409-4>, p. 77-92.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELINA, C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 305-311, 2005.

DUARTE, M. L. B. **Potencial anti-*Helicobacter pylori* de extratos hidroetanólicos de caule e folhas de *Astronium urundeuva***. 2014. 39 F. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Araraquara, 2014.

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacology Research**, v. 112, p. 4-29, 2016.

FALCI, D. R.; ROSA, F. B.; PASQUALOTTO, A. C. Comparison of nephrotoxicity associated to different lipidformulations of amphotericin B: a real-life study. **Mycosis**, v. 58, n. 2, p. 104-112, 2017.

- FANUN, M. Microemulsions as delivery systems. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, n. 5, p. 306-313, 2012.
- FERREIRA, G. L. S.; PÉREZ, A. L. A. L.; ROCHA, I. M.; PINHEIRO, M. A.; CASTRO, R. D.; CARLO, H. L.; LIMA, E. O.; CASTELLANO, L. R. Does scientific evidence for the use of natural products in the treatment of oral candidiasis exist? a systematic review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1-8, 2015.
- FILLER S.G. *Candida*-host cell receptor-ligand interactions. **Current Opinion Microbiology**, v. 9, p. 333-339, 2006.
- FLOWERS, S. A.; CÓLON, B.; WHALEY, S. G.; SCHULER, M. A.; ROGERS, P. D. Contribution of clinically derived mutations in ERG11 to azole resistance in *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 1, p. 450-460, 2015.
- GAETTO-JARDIM JÚNIOR, E.; LANDUCCI, L. F.; ARAFAT, O. K. K.; RANIERI, R. V.; RAMOS, M. M. B.; CIESIELSKI, F. I. N.; SCHWEITZER, C. M.; OKAMOTO, A. C. Antimicrobial activity of six plant extracts from the Brazilian Savanna on periodontal pathogens. **International Journal of Odontostomatology**, v. 5, n. 3, p. 249-256, 2011.
- GAINO, A. P. S. C.; SILVA, A. M.; MORAES, M. A.; ALVES, P. F.; MORAES, M. L. T.; FREITAS, M. L. M.; SEBBENN, A. M. Understanding the effects of isolation on seed and pollen flow, spatial genetic structure and effective population size of the dioecious tropical tree species *Myrcodruon urundeuva*. **Conservation Genetics Resources**, v. 11, n. 5, p. 1631-1643, 2010.
- GARCIA-CUESTA, C.; SARRION-PÉREZ, M. G.; BAGÁN, J. V. Current treatment of oral candidiasis: a literature review. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, v. 6, n. 5, p. 576-582, 2014.
- GALVALDA, J.; MEIJE, Y.; FORTÚN, J.; ROILIDES, E.; SALIBA, F.; LORTHOLARY, O.; MUÑOZ, P.; GROSSI, P.; CUENCA-ESTRELLA, M. Invasive fungal infections in solid organ transplant recipients. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 7, p. 27-48, 2014.
- GHOSH, V.; SARANYA, S.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Antibacterial microemulsion prevents sepsis and triggers healing of wound in wistar rats. **Colloids Surf. B: Biointerfaces**, v. 105, p. 152-157, 2013.
- GIRARDOT, M.; IMBERT, C. Natural sources as innovative solutions against fungal biofilms. **Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health**, v. 931, p. 105-125, 2016.
- GOEL, G.; MAKKAR, H. P. S. Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, n. 4, p. 729-739, 2012.
- GOYAL, U., ARORA, R., AGGARWAL, G. Formulation design and evaluation of a self-microemulsifying drug delivery system of lovastatin. **Acta Pharm.**, v. 62, n. 3, p. 357-370, 2012.

GUDIÑA, E. J.; ROCHA, V.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *Paracasei* A20. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 419-424, 2010.

GUINEA, J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 6, p. 5-10, 2014.

GUNTHER, L. S. A.; MARTINS, H. P. R.; GIMENES, F.; ABREU, A. L. P.; CONSOLARO, M. E. L.; SVIDZINSKI, T. I. E. Prevalence of *Candida albicans* and non-*albicans* isolates from vaginal secretions: comparative evaluation of colonization, vaginal candidiasis and recurrent vaginal candidiasis in diabetic and non-diabetic women. **São Paulo Medical Journal**, v. 132, n. 2, p. 116-120, 2014.

HAWSER, S.; ISLAM, K. Comparisons of the effects of fungicidal and fungistatic antifungal agents on the morphogenetic transformation of *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 43, n. 3, p. 411-413, 1999

HERÁNDEZ, V.; MORA, F.; ARAQUE, M.; MONTIJO, S.; ROJAS, L.; MELÉNDEZ, P.; TOMMASI, N. Chemical composition and antibacterial activity of *Astronium graveolens* Jacq essential oil. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 41, n. 2, p. 89-94, 2013.

HINDLER, J. Antimicrobial susceptibility testing, **Clinical microbiology procedures handbook**. American Society for Microbiology, H.D. Isenberg (ed.): Washington, D.C., 1995, p. 5.18.11–15.18.20.

HOEHAMER, C. F.; CUMMINGS, E. D.; HILLIARD, G. M.; MORSCHHAUSER, J.; ROGERS, P. D. Upc2p-associated differential protein expression in *Candida albicans*. **Proteomics**, v. 9, n. 20, p. 4726-4730, 2009.

HÖRNER, M.; GIGLIO, V. F.; SANTOS, A. J. R. W. A.; WESTPHALEN, A. B.; INGLESIAS, B. A.; MARTINS, P. R.; AMARAL, C. H.; MICHELOT, T. M.; REETZ, L. G. B.; BERTONCHELI, C. M.; PARAGINSKI, G. L.; HORNER, R. Triazenos e atividade antibacteriana. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 441-449, 2008.

KAUR, S.; MONDAL, P. Study of Total Phenolic and Flavonoid Content, Antioxidant Activity and Antimicrobial Properties of Medicinal Plants. **Journal of Microbiology & Experimentation**, v. 1, n. 1, 2014.

KHANBABAEE, K.; LÖTZERICH, K. Efficient total synthesis of the natural products 2,3,4,6-tetra-O-galloyl-D-glucopyranose, 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucopyranose and the unnatural 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-α-D-glucopyranose. **Tetrahedron**, v. 53, p. 10725-10732, 1997.

KUCHARÍKOVÁ, S.; TOURNU, H.; HOLTAPPELS, M.; VAN DIJCK, P.; LAGROU, K. *In vivo* efficacy of anidulafungin against mature *Candida albicans* biofilms in a novel rat model of catheter-associated candidiasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 10, p. 4474-4475, 2010.

- LAFAYETTE, S. L.; COLLINS, C.; ZAAS, A. K.; SCHELL, W. A.; BETANCOURT-QUIROZ, M.; GUNATILAKA, A. A. L.; PERFECT, J. R.; COWEN, L. E. PKC Signaling regulates drug resistance of the fungal pathogen *Candida albicans* via circuitry comprised of Mkc1, calcineurin, and Hsp90. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 8, e1001069, 2010.
- LIM, C. S.; ROSLI, R.; SEOW, H. F.; CHONG, P. P. *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 31, n. 1, p. 21-31, 2012.
- LI, Z.J.; LIU, M.; DAWUTI, G.; DOU, Q.; MA, Y.; LIU, H.G.; AIBAI, S. Antifungal activity of gallic acid *in vitro* and *in vivo*. **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 7, p. 1039-1045, 2017.
- LIU, S.; HOU, Y.; CHEN, X.; GAO, Y.; LI, H.; SUN, S. Combination of fluconazole with non-antifungal agents: a promising approach to cope with resistant *Candida albicans* infections and insight into new antifungal agent discovery. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 43, n. 5, p. 395-402, 2014.
- LOHBERGER, A.; COSTE, A. T.; SANGLARD, D. Distinct roles of *Candida albicans* drug resistance transcription factors TAC1, MRR1, and UPC2 in virulence. **Eucaryotic cell**, v. 13, n. 1, p. 127-142, 2014.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 5. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2008. v. 1, 384 p.
- LUYT, C. E.; BRÉCHOT, N.; TROUILLET, J. L.; CHASTRE, J. Antibiotic stewardship in the intensive care unit. **Critical Care**, v. 18, p. 480-492, 2014.
- MACHADO, A. C.; OLIVEIRA, R. C. Medicamentos Fitoterápicos na odontologia: evidências e perspectivas sobre o uso da aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Allemão). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 283-289, 2014.
- MARCHAIM, D.; LEMANEK, L.; BHEEMREDDY, S.; KAYE, K. S.; SOBEL, J. D. Fluconazole-resistant *Candida albicans* vulvovaginitis. **Obstetrics & Gynecology**, v. 120, n. 6, p. 1407-1414, 2012.
- MAROYI, A. Traditional use of medicinal plants in south-central Zimbabwe: review and perspectives. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 9, doi: 10.1186/1746-4269-9-31, 2013.
- MARRAZZO, J. M. Vulvovaginal candidiasis: over the counter doesn't seem to lead to resistance. **British Medical Journal**, v. 326, p. 993-994, 2003.
- MARTIN, C.; LOW, W. L.; GUPTA, A.; AMIN, M. C. I. M.; RADECKA, I.; BRITLAND, S. T.; RAJ, P.; KENWARD, K. Strategies for Antimicrobial Drug Delivery to Biofilm. **Current Pharmaceutical Design**, v. 21, p. 43-66, 2015.
- MARTINEZ, L. R.; FRIES, B. C. Fungal Biofilms: Relevance in the Setting of Human Disease. **Current Fungal Infectious Reports**, v. 4, n. 4, p. 266-275, 2010.

- MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2., p. 119-128, 2013.
- MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions *versus* microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, v. 8, p. 1719-1729, 2012.
- MERENSTEIN, D.; HU, H.; WANG, C.; HAMILTON, P.; BLACKMON, M.; CHEN, H.; CALDERONE, R.; LI, D. Colonization by *Candida* species of the oral and vaginal mucosa in HIV-infected and noninfected women. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 29, n. 1, p. 30-34, 2013.
- MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; McLAUGHLIN. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 45, n. 5, p. 31-34, 1982.
- MOGHIMIPOUR, E.; SÁLIMI, A.; EFTEKHARI, S. Design and Characterization of Microemulsion Systems for Naproxen. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 3, n. 1, p. 63-71, 2013.
- MORETTI, M. L.; TRABASSO, P.; LYRA, L.; FAGNANI, R.; RESENDE, M. R.; CARDOSO, L. G. O.; SCHREIBER, A. Z. Is the incidence of candidemia caused by *Candida glabrata* increasing in Brazil? Five-year surveillance of *Candida* bloodstream infection in a university reference hospital in southeast Brazil. **Medical Mycology**, v. 51, n. 3, p. 225-230, 2013.
- MORIO, F.; PAGNIEZ, F.; BESSE, M.; GAY-ANDRIEU, F.; MIEGEVILLE, M.; PAPE, P. L. Deciphering azole resistance mechanisms with a focus on transcription factor-encoding genes TAC1, MRR1 and UPC2 in a set of fluconazole-resistant clinical isolates of *Candida albicans*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 42, n. 5, p. 410-415, 2013.
- MUKAREMERA, L.; LEE, K. K.; MORA-MONTES, H. M.; GOW, N. A. R. *Candida albicans* Yeast, Pseudohyphal, and Hyphal Morphogenesis Differentially Affects Immune Recognition. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. 629, doi:10.3389/fimmu.2017.00629, 2017.
- NASRI, H.; SHIRZAD, H. Toxicity and safety of medicinal plants. **Journal of HerbMed Pharmacology**, v. 2, n. 2, p. 21-22, 2013.
- NETEA, M. G.; JOOSTEN, L. A. B.; VAN DER MEER, J. W. M.; KULLBERG, B. J.; VAN DE VEERDONK, F. L. Immune defence against *Candida* fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 10, p. 630-642, 2015.
- NOGUEIRA, C. M.; PARMANHAN, B. R.; FARIAS, P. P. CORRÊA, A. G. A importância crescente dos carboidratos em química medicinal. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 2, p. 149-159, 2009.
- NUNES, Y. R. F.; FAGUNDES, M.; ALMEIDA, H. S.; VELOSO, M. D. M. Aspectos ecológicos da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Allemão – Anacardiaceae): fenologia e germinação de sementes. **Revista Árvore**, v. 32, n. 2, p. 233-243, 2008.

- OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; COELHO, T. S.; SILVA, P. E. A.; LOURENÇO, M. C. S.; LEITÃO, S. G. Ethnopharmacological versus random plant selection methods for the evaluation of the antimycobacterial activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 5, p. 793-806, 2011.
- OOSHIRO, A.; HIRADATE, S.; KAWANO, S.; TAKUSHI, T.; FUJII, Y.; NATSUME, M.; ABE, H. Identification and activity of ethyl gallate as an antimicrobial compound produced by *Geranium carolinianum*. **Weed Biology and Management**, v. 9, n. 2, p. 169-172, 2009.
- ORME, I. et al. Search for new drugs for treatment of tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 7, p. 1943-1946, 2001.
- PAPPAS, P. G.; KAUFFMAN, C. A.; ANDES, D. R.; CLANCY, C. J.; MARR, K. A.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REBOLI, A. C.; SCHUSTER, M. G.; VAZQUEZ, J. A.; WALSH, T. J.; ZAOUTIS, T. E.; SOBEL, J. D. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the infectious diseases society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, n. 4, p. 1-50, 2016.
- PARK, K. Controlled drug delivery systems: Past forward and future back. **Journal of Controlled Release**, v. 190, n. 28, p. 3-8, 2014.
- PARRA, A. L.; YHEBRA, R. S.; SARDIÑAS, G.; BUELA, L. I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD<sub>50</sub> value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, p. 395-400, 2001.
- PAVAN, F. R.; MAIA, P. I. S.; LEITE, S. R. A.; DEFLON, V. M.; BATISTA, A. A.; SATO, D. N.; FRANZBLAU, S. G.; LEITE, C. Q. F. Thiosemicarbazones, semicarbazones, dithiocarbazates and hydrazide/hydrazones: anti- *Mycobacterium tuberculosis* activity and cytotoxicity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 5, p. 1898-1905, 2010.
- PEIXOTO, J. V.; ROCHA, M. G.; NASCIMENTO, R. T. L.; MOREIRA, V. V.; KASHIWABARA, T. G. B. Candidíase - uma revisão de literatura. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 8, n. 2, p. 75-82, 2014.
- PEREA, S.; LOPEZ-RIBOT, J. L.; KIRKPATRICK, W. R.; MCATEE, R. K.; SANTILLÁN, R. A.; MARTÍNEZ, M.; CALABRESE, D.; SANGIARD, D.; PATTERSON, T. F. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus infected patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 10, p. 2676-2684, 2001.
- PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.
- PHAM, C. D.; IQBAL, N.; BOLDEN, C. B.; KUYKENDALL, R. J.; HARRISON, L. H.; FARLEY, M. M.; SCHAFFNER, W.; BELDAVS, Z. G.; CHILLER, T. M.; PARK, B. J.; CLEVELAND, A. A.; LOCKHART, S. R. Role of FKS mutations in *Candida glabrata*: MIC values, echinocandin resistance, and multidrug resistance. **Antimicrobials Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4690-4696, 2014.

- PIERCE, C. G.; UPPULURI, P.; TRISTAN, A. R.; WORMLEY, F. L.; MOWAT, E.; RAMAGE, G.; LOPEZ-RIBOT, J. L. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **Nature Protocols**, v. 3, n. 9, p. 1494-1500, 2008.
- PIERCE, C. G.; CHATURVEDI, A. K.; LAZZELL, A. L.; POWELL, A. T.; SAVILLE, S. P.; MCHARDY, S. F.; LOPEZ-RIBOT, J. L. A novel small molecule inhibitor of *Candida albicans* biofilm formation, filamentation and virulence with low potential for the development of resistance. **NPJ Biofilms and Microbiomes**, v. 1, pii: 15012, 2015.
- PINHO, L.; SOUZA, P. N. S.; SOBRINHO, E. M.; ALMEIDA, A. C.; MARTINS, E. R. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. **Ciência Rural**, v. 42, n. 2, p. 326-331, 2012.
- RAJENDRAN, R.; RADHAI, R.; KOTRESH, T. M.; CSISZAR, E. Development of antimicrobial cotton fabrics using herb loaded nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 2, p. 613-617, 2013.
- RAMOS, M. A. S.; CALIXTO, G.; TOLEDO, L. G.; BONIFÁCIO, B. V.; SANTOS, L. C.; ALMEIDA, M. T. G.; CHORILLI, M.; BAUAB, T. M. 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. 2015, p. 7455-7466, 2015.
- RAMOS, M. A. S.; SILVA, P. B.; SPÓSITO, L.; TOLEDO, L. G.; BONIFÁCIO, B. V.; RODERO, C. F.; SANTOS, K. C.; CHORILLI, M.; BAUAB, T. M. Nanotechnology-based drug delivery systems for control of microbial biofilms: a review. **International Journal of Nanomedicine**, 2018.
- RATTI, B. A.; GODOY, J. S. R.; MENDONÇA, P. S. B.; BIDÓIA, D. L.; NAKAMURA, T. U.; NAKAMURA, C. T.; CONSOLARO, M. E. L.; SVIDZINSKI, T. I. E.; SILVA, S. O. Microbicidal activity of neutrophils is inhibited by isolates from recurrent vaginal candidiasis (RVVC) caused by *Candida albicans* through fungal thioredoxin reductase. **Cellular Immunology**, v. 293, n. 1, p. 22-29, 2015.
- REICHHARDT, C.; STEVENS, D. A.; CEGELSKI, L. Fungal biofilm composition and opportunities in drug discovery. **Future Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 12, p. 1455-1468, 2016.
- REIS, B.; MARTINS, M.; BARRETO, B.; MILHAZES, N.; GARRIDO, E. M.; SILVA, P.; GARRIDO, J.; BORGES, F. Structure–property–activity relationship of phenolic acids and derivatives protocatechuic acid alkyl esters. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 11, p. 6986-6993, 2010.
- SÁ, R. A.; NAPOLEÃO, T. H.; SANTOS, N. D. L.; GOMES, F. S.; ALBUQUERQUE, A. C.; XAVIER, H. S.; COELHO, L. C. B. B.; BIEBER, L. W.; PAIVA, P. M. G. Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva*

heartwood lectin. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 62, n. 4, p. 460–464, 2008.

SÁ, R. A.; ARGOLO, A. C. C.; NAPOLEÃO, T. H.; GOMES, F. S.; SANTOS, N. D. L.; MELO, C. M. L.; AURISTELA, C. A.; XAVIER, H. S.; COELHO, L. C. B. B.; BIEBER, L. W.; PAIVA, P. M. G. Antioxidant, *Fusarium* growth inhibition and *Nasutitermes corniger* repellent activities of secondary metabolites from *Myracrodruon urundeuva* heartwood. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 4, p. 470-477, 2009.

SACHIN, C. D.; RUCHI, K.; SANTOSH, S. In vitro evaluation of proteinase, phospholipase and haemolysin activities of *Candida* species isolated from clinical specimens. **International Journal of Medicine and Biomedical Research**, v. 1, n. 2, p. 153-157, 2012.

SARDI, J. C. O.; SCORZONI, L.; BERNARDI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES GIANNINI, M. J. S. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 10-24, 2013.

SAVOIA, D. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. **Future Microbiology**, v. 7, n. 8, p. 979-990, 2012.

SCIENCE PHOTO LIBRARY. *Candida albicans* yeast stage, SEM. Disponível em: <<https://www.sciencephoto.com/media/874098/view>>. Acesso em: 16 nov. 2017.

SCIENCE PHOTO LIBRARY. *Candida albicans*, yeast and new hyphae stages, SEM. Disponível em: <<https://www.sciencephoto.com/media/874091/view>>. Acesso em: 16 nov. 2017.

SCIENCE PHOTO LIBRARY. *Candida albicans* yeast and hyphae stages, SEM. Disponível em: <<https://www.sciencephoto.com/media/874090/view>>. Acesso em: 16 nov. 2017.

SCIENCE PHOTO LIBRARY. Yeast and extracellular matrix, SEM. Disponível em: <<https://www.sciencephoto.com/media/694272/view>>. Acesso em: 16 nov. 2017d.

SHAH, A. A.; AAMERA, M.; MAYANK, M.; KULKARNI, D. Pathogenesis of oral candidiasis. **Indian Journal of Dental Advancements**, v. 6, n. 2, p. 1529, 2014.

SHERRY, L.; KEAN, R.; MCKLOUD, E.; O'DONNELL, L. E.; METCALFE, R.; JONES, B. L.; RAMAGE, G. Biofilms formed by isolates from recurrent vulvovaginal candidiasis patients are heterogeneous and insensitive to fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 10.1128/AAC.01065-17, 2017.

SILVA, V. C.; NAPOLITANO, A.; ELETTO, D.; RODRIGUES, C. M.; PIZZA, C.; VILEGAS, W. Characterization of gallotannins from *Astronium* species by flow injection analysis- electrospray ionization-ion trap-tandem mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **European Journal of Mass Spectrometry**, v. 17, n. 4, p. 365-375, 2011.

- SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W.; AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 2, p. 288-305, 2012.
- SILVA, P. B.; RAMOS, M. A. S.; BONIFÁCIO, B. V.; NEGRI, K. M. S.; SATO, M. R.; BAUAB, T. M.; CHORILLI, M. Nanotechnological strategies for vaginal administration of drugs - a review. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 10, n. 9, p. 2218-2243, 2014.
- SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. 7 ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 486 p.
- SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/ Ed. UFSC, 2010. 833 p.
- SOBEL, J. D. Recurrent vulvovaginal candidiasis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 214, n. 1, p. 15-21, 2016.
- SOLIS, P. N.; WRIGHT, C. W.; ANDERSON, M. M.; GUPTA, M. P.; PHILLIPSON, J. D. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (Brine Shrimp). **Planta Medica**, v. 59, n. 3, p. 250-252, 1993.
- SOLL, D. R.; DANIELS, K. J. Plasticity of *Candida albicans* biofilms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, p. 565-595, 2016.
- SOUZA, S. M. C.; AQUINO, L. C. M.; MILACH JR, A. C.; BANDEIRA, M. A. M.; NOBRE, M. E. P.; VIANA, G. S. B. Antiinflammatory and antiulcer properties of tannins from *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) in Rodents. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 3, p. 220-225, 2007.
- SOUZA, L. P. **Padronização de extratos vegetais: *Astronium urundeuva* (Anacardiaceae)**. 2012. 94 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Araraquara, 2012.
- SOUZA, A. C. R.; FUCHS, B. B.; PINHATI, H. M. S.; SIQUEIRA, R. A.; HAGEN, F.; MEIS, J. F.; MYLONAKIS, E.; COLOMBO, A. L. *Candida parapsilosis* resistance to fluconazole: molecular mechanisms and *in vivo* impact in infected *Galleria mellonella* Larvae. **Antimicrobials Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 10, p. 6581-6587, 2015.
- SUBRAMANIAN, R.; CHANDRA, M.; YOGAPRIYA, S.; ARAVINDH, S.; PONMURUGAN, K. Isolation of methyl gallate from mango twigs and its anti-biofilm activity. **Journal of Biologically Active Products from Nature**, v. 6, n. 5-6, 2016.
- TEODORO, G. R.; ELLEPOLA, K.; SENEVIRATNE, C. J.; KOGA-ITO, C. Potential use of phenolic acids as anti-*Candida* agents: a review. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015.

- TRENTIN, D. S.; SILVA, D. B.; AMARAL, M. W.; ZIMMER, K. R.; SILVA, M. V.; LOPES, N. P.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Tannins possessing bacteriostatic effect impair *Pseudomonas aeruginosa* adhesion and biofilm formation. **PLoS One**. V. 8, n. 6, p. e66257, 2013.
- VALENTE, L. M. M.; ALVES, F. F.; BEZERRA, G. M.; ALMEIDA, M. B. S.; ROSARIO, S. L.; MAZZEI, J. L.; AVILA, L. A.; SIANI, A. C. Desenvolvimento e aplicação de metodologia por cromatografia em camada delgada para determinação do perfil de alcalóides oxindólicos pentacíclicos nas espécies sul-americanas do gênero *Uncaria*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 216-223, 2006.
- VAN SCHALKWYK, J.; YUDIN, M. H.; Vulvovaginitis: screening for and management of trichomoniasis, vulvovaginal candidiasis, and bacterial vaginosis. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada**, v. 37, n. 3, p. 266-274, 2015.
- WANG, P.; LOMBI, E.; ZHAO, F. J.; KOPITTKE, P. M. Nanotechnology: a new opportunity in plant sciences. **Trends in Plant Science**, v. 21, n. 8, p. 699-712, 2016.
- WENDAHOON, C.; CALDERON, P.; GAGNON, D. Evaluation of selected medicinal plants extracted in different ethanol concentrations for antibacterial activity against human pathogens. **Journal of Medicinally Active Plants**, v. 1, n. 2, p. 60-68, 2012.
- WHALEY, S. G.; BERKOW, E. L.; RYBAK, J. M.; NISHIMOTO, A. T.; BARKER, K. S.; ROGERS, P. D. Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-*albicans Candida* species. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 2173, 2017. doi: 10.3389/fmicb.2016.02173
- WHITE, T. C. Increased mRNA Levels of *ERG16*, *CDR*, and *MDR1* correlate with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with Human Immunodeficiency Virus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 7, p. 1482-1487, 1997.
- WISSING, S. A. et. al. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 9, p. 1257-1272, 2004.
- YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 10, p. 15-105, 2014.
- ZHU, W.; FILLER, S. G. Interactions of *Candida albicans* with Epithelial Cells. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 273-282, 2010.