



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

ALINE DA GRAÇA SAMPAIO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE APLICAÇÃO DO
ÁCIDO ELÁGICO NANOENCAPSULADO EM
CICLODEXTRINA NO TRATAMENTO DE CANDIDOSE
BUCAL**

2019

ALINE DA GRAÇA SAMPAIO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DO ÁCIDO ELÁGICO
NANOENCAPSULADO EM CICLODEXTRINA NO TRATAMENTO DA
CANDIDOSE BUCAL**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL.

Área: Microbiologia/Imunologia. Linha de pesquisa: Métodos de controle de micro-organismo de interesse médico-odontológico.

Orientadora: Profa. Tit. Cristiane Yumi Koga-Ito
Coorientadora: Prof. Dra. Aline Vidal Lacerda Gontijo

São José dos Campos

2019

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2019]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Sampaio, Aline da Graça

Avaliação do potencial de aplicação do ácido elágico nanoencapsulado em ciclodextrina no tratamento de candidose bucal / Aline da Graça Sampaio. - São José dos Campos : [s.n.], 2019.
98 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2019.

Orientadora: Cristiane Yumi Koga-ito

Coorientadora: Aline Vidal Lacerda Gontijo

1. Candida albicans. 2. Ácido elágico. 3. Ciclodextrina. I. Koga-ito, Cristiane Yumi, orient. II. Gontijo, Aline Vidal Lacerda, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Tit. Cristiane Yumi Koga Ito (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Faculdade de Saúde e Biociências

Campus de Paraná

Profa. Dra. Aline Chiodi Borges

Instituto Taubaté de Ensino Superior

Faculdade de Farmácia de Taubaté

Campus de Taubaté

São José dos Campos, 28 de março de 2019.

DEDICATÓRIA

A Deus, por guiar o meu caminho, por me conceder o prazer de conhecer pessoas maravilhosas ao longo dessa jornada e por me conduzir a mais essa conquista.

Aos meus pais pelo incentivo, torcida, compreensão pelas visitas curtas e por todo o investimento em minha educação.

As minhas irmãs, pela torcida e incentivo.

A Luciene, Ariene e Eduardo José pelo apoio, incentivo e animação pelas minhas conquistas.

Ao Eduardo, por me escutar, não me deixar desanimar, me alegrar e acreditar em mim em todo o momento. Divido com você esta conquista.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, campus São José dos Campos, ao Programa de pós-graduação em Biopatologia Bucal, Docentes e pessoal técnico administrativo.

À CAPES pela concessão inicial da bolsa de Mestrado.

À Fapesp (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) por acreditar no potencial inovador deste trabalho e conceder a bolsa de mestrado (Processo FAPESP 2016/21207-0, vinculado ao auxílio à Pesquisa Regular FAPESP 2016/07196-6).

À minha orientadora Profa Tit. Cristiane Yumi Koga-Ito, pela confiança, compreensão, ensinamento, amizade e pela oportunidade de continuar na área da pesquisa. Muito obrigada por ter respondido a um simples e-mail meu, quando eu ainda buscava uma oportunidade na iniciação científica.

À minha coorientadora Profa Dra. Aline Vidal Lacerda Gontijo pelos ensinamentos compartilhados, paciência e orientação.

À Dra. Helena Marcola (UFRJ) pela colaboração e confiança nesse projeto.

Ao Prof. Tit. Marcos José Salvador (Unicamp) e Prof. Tit. Gilmar Thim (ITA) pela concessão do uso de equipamentos essenciais para a execução deste projeto.

À Assistente de Suporte Acadêmico Clélia Aparecida de Paiva, por todas as ajudas, pelos ensinamentos compartilhados dicas e paciência. Obrigada, sempre aprendo muito ao seu lado.

Aos colegas de laboratório Néia, Lady Daiane, Sabrina, Mariana, Laura, Gabriela, Márcia, Aline, Magno e Leandro, pela amizade, paciência, desabafo, dicas, risadas, pelas caronas que sempre renderam muitos risos, conversas e conselhos. Com vocês tudo foi mais alegre. Muito do que aprendi nesses últimos anos foi graças a vocês.

À Profa Adj. Mônica Fernandes Gomes pelo apoio na execução desse trabalho.

"Sei que meu trabalho é uma gota no oceano. Mas sem ele, o oceano seria menor". Madre Teresa de Calcutá

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 PROPOSIÇÃO	18
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 Aspectos éticos	19
3.2 Cepas e condições de crescimento.....	19
3.3 Complexação do ácido elágico com ciclodextrina e caracterização	20
3.3.1 Diagrama de solubilidade e secagem por atomização	20
3.3.2 Avaliação da porcentagem de ácido elágico presente na formulação .	21
3.3.3 Espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	21
3.3.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	22
3.4 Teste de susceptibilidade de <i>Candida albicans</i> frente ao ácido elágico (AE) e complexado em ácido elágico (AE/HP- β -CD).....	22
3.4.1 Padronização do inóculo	22
3.4.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em cepas de referência.....	23
3.5 Efeito do AE e AE complexado em HP- β -CD sobre biofilmes de <i>C.</i> <i>albicans</i>	24
3.6 Ensaio da capacidade de infecção de <i>C. albicans</i> e avaliação do efeito do AE em modelo <i>in vivo</i> de <i>Drosophila melanogaster</i>	25
3.7 Avaliação dos efeitos celulares de AE sobre fatores de virulência de <i>C.</i> <i>albicans</i> (Prospecção dos mecanismos de ação).....	29
3.7.1 Determinação do efeito sobre a morfologia da célula fúngica	30
3.7.2 Análise do efeito de AE sobre a parede celular fúngica de <i>C. albicans</i>	30
3.7.3 Efeito do AE sobre a biossíntese de ergosterol	31

3.7.4 Efeito do AE encapsulado sobre a morfogênese de <i>C. albicans</i> na transição hifa-levedura	33
3.8 Avaliação do ácido elágico em concentração subinibitória sobre fatores de virulência de <i>C. albicans</i>	34
3.8.1 Ação do AE sobre a produção da enzima fosfolipase	34
3.8.2 Ação do AE sobre a produção da enzima proteinase	35
3.8.3 Ação do AE sobre a aderência de células fúngicas <i>C. albicans</i> às células epiteliais bucais	36
3.9 Avaliação da toxicidade do ácido elágico não encapsulado (AE) e ácido elágico encapsulado em HP- β -CD	37
3.9.1 Avaliação <i>in vitro</i> da citotoxicidade do ácido elágico encapsulado em HP- β -CD	37
3.9.2 Avaliação da toxicidade de AE em modelo <i>in vivo</i> de <i>Drosophila melanogaster</i>	38
3.10 Efeito do AE encapsulado no tratamento de lesões de candidose oral induzida e modelo murino	39
3.11 Análise estatística	44
4 RESULTADO	45
4.1 Complexação do ácido elágico com ciclodextrina e caracterização	45
4.1.1 Diagrama de solubilidade e secagem por atomização	45
4.1.2 Avaliação da porcentagem de ácido elágico presente na formulação	46
4.1.3 Espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	47
4.1.4 Microscopia eletrônica de varredura	49
4.2 Teste de suscetibilidade de <i>C. albicans</i> frente ao ácido elágico (AE) e de ácido elágico complexado	51
4.2.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em cepas de referência	51

4.3 Efeito do AE e AE complexado em HP- β -CD sobre biofilmes de <i>C. albicans</i>	51
4.4 Avaliação da atividade antifúngica do AE em modelo <i>in vivo</i> de <i>Drosophila melanogaster</i>	53
4.5 Avaliação dos efeitos celulares de AE sobre fatores de virulência de <i>C. albicans</i> (Prospecção dos mecanismos de ação).....	54
4.5.1 Determinação do efeito de AE sobre a morfologia da célula fúngica .	54
4.5.2 Análise do efeito de AE sobre a parede celular fúngica de <i>C. albicans</i>	56
4.5.3 Efeito do AE sobre biossíntese de ergosterol de membrana	57
4.5.4 Efeito do AE sobre a morfogênese de <i>C. albicans</i> na transição hifa-levedura	58
4.6 Avaliação de AE em concentração subinibitória sobre fatores de virulência de <i>C. albicans</i>	60
4.6.1 Ação do AE sobre a produção da enzima fosfolipase	60
4.6.2 Ação do AE sobre a produção da enzima proteinase	61
4.6.3 Ação do AE sobre a aderência de células fúngicas <i>C. albicans</i> às células epiteliais bucais	62
4.7 Avaliação da toxicidade do ácido elágico	63
4.7.1 Avaliação <i>in vitro</i> da citotoxicidade do ácido elágico não complexado e complexado em HP- β -CD	63
4.7.2 Teste de toxicidade de ácido elágico (AE) em modelo de <i>Drosophila melanogaster</i>	64
4.8 Efeito do AE encapsulado no tratamento de lesões de candidose oral induzida em modelo murino.....	65
4.8.1 Análise histopatológica	65
4.8.2 Contagem de hifas de <i>C. albicans</i> invadindo o epitélio.....	71
4.8.3 Análise microbiológica.....	73
5 DISCUSSÃO	76

6 CONCLUSÃO	86
REFERÊNCIAS	87
ANEXO.....	98

Sampaio AG. Avaliação do potencial de aplicação do ácido elágico nanoencapsulado em ciclodextrina no tratamento da candidose bucal [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2019.

RESUMO

O aumento crescente da prevalência das infecções fúngicas no cenário mundial e aumento da ocorrência de resistência aos antifúngicos convencionais sugerem que pesquisas para a descoberta de novas moléculas antifúngicas são urgentemente necessárias. O objetivo geral deste estudo é contribuir para a prospecção de alternativas terapêuticas, avaliando nanoencapsulados da substância bioativa ácido elágico (NAE) no tratamento da candidose bucal. Os seguintes objetivos específicos foram: complexar ácido elágico em ciclodextrina, em concentração com atividade antifúngica frente *C. albicans*; caracterizar quimicamente o encapsulado; prospectar possíveis mecanismos de ação; avaliar ação de concentrações subinibitórias sobre a produção de exoenzimas e aderência às células epiteliais; avaliar citotoxicidade do NAE nas condições de tratamento efetivas *in vitro* e *in vivo* (*Drosophila melanogaster*) e avaliar ação no tratamento *in vivo* de lesões de candidose oral induzida em modelo murino. Os dados foram analisados estatisticamente, adotando-se significância de 5%. HP- β -CD formou complexos solúveis de inclusão com AE. A porcentagem de AE/HP- β -CD foi de $15,25 \pm 0,49\%$. As análises de MEV e FTIR confirmaram a formação de complexo de inclusão. AE/HP- β -CD manteve a atividade antifúngica do AE puro, com CIM 25 $\mu\text{g/ml}$ para *C. albicans* ATCC 18804 e 50 $\mu\text{g/ml}$ para *C. albicans* SC 5314. O tratamento de *C. albicans* com sub-CIMs indicou aumento da CIM na presença de sorbitol para ATCC 18804 (50 $\mu\text{g/ml}$), sugerindo ação sobre parede celular. Os resultados sugerem que não há ação sobre membrana celular. Não foi detectado efeito sobre morfogênese e produção de enzimas extracelulares. Efeito protetor de AE a 3,2, 6,4 e 32 $\mu\text{g/ml}$ foi observado em modelo *D. melanogaster* infectado com *C. albicans* que resultou na sobrevivência de 45, 33 e 34%. Baixa toxicidade foi observada nas concentrações de 200 e 250 $\mu\text{g/ml}$. No modelo de candidose bucal em camundongos foi observada redução significativa da invasão de hifas no epitélio no grupo tratado AE/HP- β -CD em relação aos controles, em 24 horas e 48 horas. Conclui-se que AE/HP- β -CD apresentou efeito inibitório sobre *C. albicans in vitro*, com baixa toxicidade. Em modelo *Drosophila melanogaster* apresentou efeito protetor frente à infecção fúngica. Em modelo murino levou à redução na invasão epitelial pelo fungo.

Palavras-chave: *Candida albicans*. Ácido elágico. Ciclodextrina.

Sampaio AG. Evaluation of the potential application of cyclodextrin nanoencapsulated ellagic acid for the treatment of oral candidosis [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2019.

ABSTRACT

The increase in the prevalence of fungal infections worldwide and the rise in the occurrence of antifungal resistance suggest that new researches for the discovery of antifungal molecules are needed. The aim of this study is to contribute to the prospection of therapeutic alternatives, evaluating nanoencapsulates of ellagic acid (NAE) for the treatment of oral candidosis. In order to reach the general aim, the following specific objectives were determined: to complex the ellagic acid in cyclodextrin at effective concentration against *C. albicans*; to chemically characterize the encapsulate; to test the activity of the encapsulate using an invasive candidosis in vitro model, searching for the mechanisms of action; to evaluate the activity of subinhibitory concentrations on the exoenzymes production, and adherence to epithelial cells; to evaluate the cytotoxicity of NAE in the effective treatment conditions in vitro and in vivo (*Drosophila melanogaster*); and to evaluate the in vivo effectiveness for the treatment of oral candidosis in murine model. The obtained data was statistically analyzed (level of significance 5%). HP- β -CD formed soluble inclusion complexes with EA. The percentage of EA/HP- β -CD was $15.25 \pm 0.49\%$. SEM and FTIR analyses confirmed the formation of inclusion complex. AE/HP- β -CD showed the same antifungal activity of pure EA with MIC value of 25 $\mu\text{g/ml}$ for *C. albicans* ATCC 18804 and 50 $\mu\text{g/ml}$ for *C. albicans* SC 5314. Treatment with sub-MIC on *C. albicans* revealed increased MIC value in the presence of sorbitol for ATCC 18804 (50 $\mu\text{g/ml}$), suggesting activity on cell wall. Results suggest no effect on cell membrane. No effects of EA on morphogenesis and production of extracellular enzymes were detected. Protective effect of EA at 3.2, 6.4 e 32 $\mu\text{g/ml}$ was observed in *D. melanogaster* model, resulting in survivals of 45, 33 and 34%. Low cytotoxicity was observed for concentrations of 200 and 250 $\mu\text{g/ml}$. In vivo tests in murine models indicated reduction in epithelial invasion after treatment EA/HP- β -CD for 24 and 48 h when compared to control. In conclusion, EA/HP- β -CD showed inhibitory effect on *C. albicans* in vitro, with low toxicity. Protective effect against fungal infection was observed in *D. melanogaster* model. In murine model of oral candidosis, EA/HP- β -CD reduced fungal epithelial invasion.

Keywords: *Candida albicans*. Ellagic acid. Cyclodextrin.

1 INTRODUÇÃO

A incidência de infecções fúngicas cresce em taxas alarmantes, representando um grande desafio para as áreas médicas. Este crescimento está diretamente relacionado ao aumento da população de pacientes imunocomprometidos nas últimas décadas (Jain et al., 2010). Estudos apontam para níveis bucais mais elevados de *Candida* em populações com diferentes doenças sistêmicas (de Matos et al., 2014; Pereira et al., 2012; Salvia et al., 2013), o que pode aumentar a suscetibilidade às infecções. As candidoses bucais são a forma mais comum de infecção fúngica em humanos, observada principalmente em portadores de HIV (Jayatilake, Samaranayake, 2010). Estudos apontam que 80% dos pacientes imunossuprimidos podem ser positivos para *C. albicans* na cavidade bucal, podendo a candidose orofaríngea atingir de 50 a 90% desses indivíduos durante o curso da doença de base (Fidel, 2011; Goulart et al., 2018).

Reservatórios bucais de micro-organismos oportunistas, como as leveduras do gênero *Candida*, podem comprometer a vida de pacientes imunocomprometidos, uma vez que a cavidade bucal representa uma porta de entrada para infecções sistêmicas (Senpuku et al., 2003). Dados epidemiológicos mostraram que *Candida* é o 4º agente responsável por infecções sistêmicas nosocomiais (Pfaller et al., 2010). A mortalidade associada a candidose sistêmica pode atingir 50 % em adultos e até 30 % em crianças (Chandra, Mukherjee, 2015).

Espécies de *Candida albicans* e não *albicans* possuem diversos fatores de virulência, dentre eles podemos citar: capacidade de formar biofilmes, secretar importantes enzimas hidrolíticas como a protease, fosfolipase e hemolisina, o dimorfismo (formação de hifas), além de aderência a superfícies

bióticas e abióticas (Gabriela et al., 2014; Mayer et al., 2013; Ramage et al., 2006; Williams et al., 2011).

Durante o processo de transição de comensal para oportunista, as leveduras do gênero *Candida* geram alterações transcricionais, havendo maior expressão em genes codificadores de fatores de virulência, tais como enzimas hidrolíticas e adesinas (Calderone, Fonzi, 2001; Hube, 2004). Os genes mais frequentemente citados são as SAPS (*Secreted aspartyl proteinases*), ALS (*Agglutinin-like sequence*) e HWPI (*Hyphal wall protein*) (Hoyer et al., 2008; Ramage et al., 2006; Staab et al., 2004; Teodoro et al., 2015b). Inúmeros genes, proteínas e metabólitos estão associados à manutenção fenotípica do biofilme de *Candida* e desempenham papel crítico nessa estrutura (Chandra, Mukherjee, 2015).

Para a avaliação dos fatores de virulência de *C. albicans* pode ser utilizado modelos alternativos *in vivo* tais como *Drosophila melanogaster*. Estes animais são capazes de reconhecer fungos, como *C. albicans* e ativar o sistema imune pelo receptor da via Toll, conhecido como sendo similar ao do ser humano (Abolaji et al., 2013; Chamilos et al., 2006; Davis et al., 2011; Glittenberg et al., 2011).

A ocorrência de resistência em *Candida* spp. frente aos antifúngicos convencionais é crescente (Calderone et al., 2014; Nett, 2014; Pfaller et al., 2010). Biofilmes de *Candida* são difíceis de erradicar e são frequentemente responsáveis por insucessos terapêuticos (Nett, 2014; Taff et al., 2013). A maior suscetibilidade de células planctônicas de *Candida* em relação aos biofilmes frente aos antifúngicos convencionais é relatada na literatura (Chandra e Mukherjee, 2015). Além disso, os antifúngicos convencionais possuem diversas limitações, tais como pequeno espectro de ação, interações com outras drogas, perfil farmacocinético limitado, custo elevado e importantes efeitos tóxicos (Bondaryk et al., 2013). Atualmente, o número de opções terapêuticas é bastante

limitado, sendo que apenas poucas classes de moléculas são rotineiramente prescritas na prática clínica. Apenas uma nova classe de fármaco de antifúngico, a equinocandina, foi desenvolvida nos últimos 30 anos (Roemer, Krysan, 2014). Desta forma, pesquisas em novas terapias e descoberta de novas moléculas antifúngicas são necessárias (Nett, 2014; Taff et al., 2013).

Nosso grupo de pesquisa vem realizando a busca e avaliação de moléculas apresentando ação antimicrobiana presentes em plantas brasileiras (Brighenti et al., 2014; Lourenção Brighenti et al., 2017; Teodoro et al., 2015b, 2015a). Dentre essas moléculas, o ácido elágico apresentou ação promissora contra *Candida albicans* (ATCC 18804) (Lourenção Brighenti et al., 2017) assim como o ácido gálico (Teodoro et al., 2015a).

O ácido elágico é um derivado dimérico de ácido gálico, originário de plantas que pode ser encontrado em ervas, frutas e legumes, como: framboesa, morango e nozes. Estas plantas produzem esse composto na forma de taninos hidrolisados chamados de elagitanos, conhecidos por propriedades farmacológicas envolvendo ação antioxidante, antimutagênica, antimicrobiana, anti-inflamatória (Bala et al., 2006a, 2006b; Nittayananta, 2016; Promsong et al., 2015). Promsong et al. (2015) sugeriu que esse polifenol natural tem potencial para auxiliar na restauração e melhora na imunidade inata da mucosa, prevenindo infecções superficiais. Além disso, este composto demonstrou citotoxicidade de baixa a moderada (Lourenção Brighenti et al., 2017; Sampaio et al., 2018), sugerindo potencial de aplicação clínica.

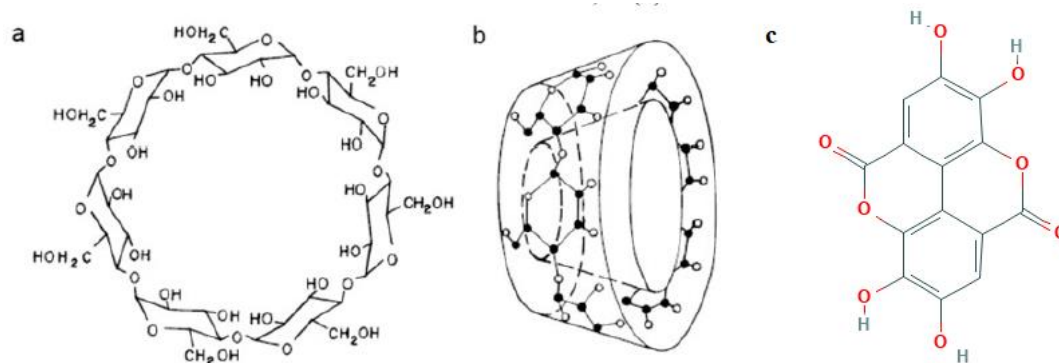
A limitação do ácido elágico é sua baixa solubilidade em água, sendo moderadamente solúvel em álcool. (Bala et al., 2006b; Lourenção Brighenti et al., 2017).

Sistemas de liberação de fármacos baseados em nano/microcápsulas têm sido estudados na literatura a fim de aumentar a solubilidade de um fármaco, favorecendo a absorção, protegendo o princípio ativo de fatores externos,

resultando em regimes posológicos mais eficientes. As ciclodextrinas (CDs) são moléculas oligossacarídeas, carreadoras macrocíclicas com capacidade de formar complexos solúveis em meio aquoso junto a fármacos lipofílicos, esta ação permite melhorar a permeabilidade de drogas, aumentando a sua biodisponibilidade, com o propósito de complexar, estabilizar substâncias, evitar a desnaturação e degradação térmica do fármaco (Loftsson et al., 2007, 2006; Rosa Teixeira et al., 2013; Teixeira, 2008). As ciclodextrinas possuem várias aplicações dentro deste contexto por serem inertes, não tóxicas e carreadoras de compostos ativos em formulações farmacêuticas e têm sido objeto de pesquisas e de desenvolvimento de novos produtos pela indústria farmacêutica (Rosa Teixeira et al., 2013; Teixeira, 2008).

As ciclodextrinas naturais são originadas de 3 formas, conhecidas como α -, β - e γ - ciclodextrina. Elas compõem 6, 7 e 8 unidades de glicose, respectivamente, interligadas por ligações α - [1,4] glicosídicas que permitem ter tamanhos variados e diferentes solubilidade (Challa et al., 2005a; Connors, 1997). A sua estrutura está ilustrada na Figura 1. Atualmente, são produzidas de forma semissintética através de conversão enzimática (Szejtli, 1998). Dentre elas temos a molécula derivada de β -CD a HP- β -CD que vem demonstrando habilidade de complexação e equilibrando solubilidades em água (Challa et al., 2005a; Teodoro et al., 2017). A ciclodextrina HP- β -CD é uma molécula derivada de β -CD que possui grupos hidroxipropil que possuem a capacidade de aumentar a solubilidade em água (> 600 mM) (Challa et al., 2005b).

Figura 1 – Esquema ilustrando a estrutura (a) forma toroidal, (b) de uma molécula de ciclodextrina e (c) estrutura da molécula de ácido elágico



Fonte: (Challa et al., 2005 ; Pubchem, 2019).

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral desse projeto é contribuir para a prospecção de alternativas terapêuticas inovadoras, avaliando o complexado da substância ácido elágico no tratamento da candidose bucal. Perseguindo o objetivo geral estabelecemos os seguintes objetivos específicos:

- a) complexar o ácido elágico em ciclodextrina ou derivados em concentração com comprovada atividade antifúngica frente a *Candida albicans*;
- b) caracterizar quimicamente o complexado;
- c) avaliar a ação do ácido elágico não complexado e complexado sobre biofilme de *C. albicans*;
- d) avaliar a ação antifúngica em modelo *in vivo* de *Drosophila melanogaster*;
- e) avaliar a ação do ácido elágico sobre a integridade da parede celular e membrana plasmática, quantidade de ergosterol e morfogênese (transição levedura-hifa), buscando possíveis mecanismos de ação;
- f) avaliar ação de ácido elágico nas concentrações subinibitórias sobre a produção de exoenzimas e aderência às células epiteliais;
- g) avaliar a citotoxicidade do ácido elágico não complexado e complexado em ciclodextrina nas condições de tratamento efetivas;
- h) avaliar a citotoxicidade do ácido elágico em modelo *in vivo* de *Drosophila melanogaster*;
- i) Avaliar ação no tratamento *in vivo* de lesões de candidose oral induzida em modelo murino.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

O presente estudo foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em experimentação Animal do ICT-CSJC UNESP, sob registro nº 05/2017.

3.2 Cepas e condições de crescimento

As seguintes cepas padrão de *Candida albicans* foram incluídas neste estudo: SC 5314 (cepa referência wild-type) e ATCC 18804 (cepa referência, isolado de lesão de candidose). Essas cepas permaneceram armazenadas em caldo Sabouraud dextrose com 20% de glicerol a -80 °C. Os inóculos utilizados nos testes foram obtidos a partir de cultura desses micro-organismos em ágar Sabouraud dextrose (SD) cultivados por 24 horas a 37 °C, em aerobiose. As células de *C. albicans* foram suspensas em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) até atingir a concentração de aproximadamente 10^6 UFC/ml (Unidades Formadoras de Colônias por mililitro), com auxílio de espectrofotômetro (λ : 530 nm; DO: 0,138)

3.3 Complexação do ácido elágico com ciclodextrina e caracterização

A fim de complexar o ácido elágico com a ciclodextrina e caracterizar tais formulações, as seguintes metodologias foram empregadas, de acordo com protocolos já descritos.

3.3.1 Diagrama de solubilidade e secagem por atomização

O diagrama de solubilidade de fase foi construído em função de uma concentração de ácido elágico em excesso (em termos de solubilidade em água) e de diferentes concentrações de 2-Hidroxipropil-Beta-Ciclodextrina (HP- β -CD). (Balducci et al., 2013; Rudrangi et al., 2015). Diferentes concentrações de HP- β -CD de 0 a 144 mM, na presença de ácido elágico em excesso (1 mg/ml), foram dissolvidos em água destilada ou solução de NaOH 0,1M, à temperatura ambiente durante 72 horas e mantidos em agitador magnético. Logo após, a solução foi filtrada em membrana de 0,45 μ m, diluído adequadamente e analisado quantitativamente por espectrofotometria em ultravioleta (UV) a 255 nm. O diagrama de fase de solubilidade foi traçado conforme concentrações de ácido elágico em função da concentração de ciclodextrina e a razão entre o ácido elágico e a ciclodextrina.

A secagem da solução de ciclodextrina mais ácido elágico (AE) foi realizada por spray dryer (Büchi Mini Spray Drying B290) utilizando os seguintes parâmetros: temperatura de entrada igual a 150 °C, temperatura de saída igual a 119 °C, aspiração igual a 100%, bombeamento igual a 10%. Preparou-se o complexo ácido elágico/ciclodextrina na proporção de 1:1 molar.

As soluções foram misturadas e depois bombeadas para dentro do equipamento spray dryer. Em seguida, foi realizada a secagem por atomização com os parâmetros determinados acima. Após secagem, as porcentagens de rendimento de CD e de ácido elágico presentes na formulação foram determinadas, em espectrofotometria UV visível.

3.3.2 Avaliação da porcentagem de ácido elágico presente na formulação

O ácido elágico presente na formulação foi quantificado por espectrofotometria UV- visível (Bala et al., 2006b). A absorbância foi verificada em espectrofotômetro para verificar a absorbância do ácido elágico a 255 nm.

3.3.3 Espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A FTIR acoplada a um sistema de reflexão total atenuada (ATR) foi realizada com o aparelho Perkin Elmer modelo Frontier em colaboração com o Instituto Tecnológico de Aeronáutica (ITA) para avaliar se houve uma complexação. Os espectros foram obtidos entre 4000 e 400 cm^{-1} a uma resolução de 4 cm^{-1} , com 16 varreduras para cada espectro.

3.3.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A variação morfológica da superfície das substâncias isoladas e/ou mistura física foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Alíquotas das amostras de AE puro, ciclodextrina HP- β -CD, HP spray dryer e mistura física da HP- β -CD /ácido elágico foram afixadas com auxílio de fita carbono sobre stub de alumínio o qual foi submetido a metalização em ouro e após realizada a Microscopia Eletrônica de Varredura (JSM-T330A, JEOL limitada, Tóquio - Japão).

3.4 Teste de susceptibilidade de *Candida albicans* frente ao ácido elágico (AE) e complexado em ácido elágico (AE/HP- β -CD)

3.4.1 Padronização do inóculo

Para a padronização do inóculo foram utilizadas as cepas de referência de *Candida albicans* SC 5314 (wild-type) e ATCC 18804 (isolado de lesão de candidose), conforme norma CLSI M-27 A3. As amostras foram preparadas conforme item 3.2. Em seguida, foram preparadas 4 diluições sequenciais diferentes (10^{-1} - 10^{-4}), plaqueadas em ágar Sabouraud dextrose conforme método de Miles e Mirsa (1931) para contagem de UFC/ml (unidade formadora de colônia por mililitro) e incubados por 24 horas a 37 °C, seguido por leitura dos resultados.

3.4.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em cepas de referência

Para os testes de suscetibilidade, foram avaliadas as cepas de *Candida albicans* SC 5314 e ATCC 18804. Os testes foram realizados conforme as normas CLSI M27-A3, para ensaios de microdiluição em placa de 96 poços, para determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Nessa etapa foi utilizado AE previamente obtido comercialmente (Cayman Chemical. Lote: 0423046). Foi definida como CIM, a concentração onde foi observado 80% (CIM) de redução do crescimento fúngico quando comparado ao grupo controle de crescimento (sem tratamento), por análise visual.

Este experimento foi realizado separadamente com AE sem ciclodextrina e com complexo AE/ HP- β -CD para o preparo da solução estoque o AE e o AE/ HP- β -CD foram diluídos em solução NaOH 0,1M. Antes do uso, ambas as substâncias testes foram sonicadas por 10 minutos, para melhor solubilização. O procedimento foi realizado em triplicata.

Nesse ensaio as amostras de *C. albicans* foram preparadas conforme item 3.2, seguido por preparo do inóculo em meio de cultura contendo RPMI 1640 (pH 7,0), na concentração de aproximadamente 10^3 UFC/ml, usado no teste de microdiluição.

As substâncias a serem testadas foram ressuspensas no meio de cultura RPMI na concentração de 100 μ g/ml. Em seguida foram colocados 200 μ l dessas substâncias na concentração inicial, na primeira coluna de placas de microtitulação com 96 poços. Após foram realizadas diluições subsequentes de 100 μ l dessas substâncias iniciais em 100 μ l de RPMI previamente pipetados nas colunas consecutivas da placa de microtitulação de 96 poços. Ao final, alíquotas de 100 μ l do inóculo foram adicionados aos poços e foram obtidas

concentrações entre 50 µg/ml até 0,08 µg/ml. Para fiscalização do teste foram mantidos poços contendo 2 controles diferentes: o controle de crescimento sem a presença da substância testada (controle positivo) e o controle contendo somente meio de cultura (controle negativo).

As placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C e posteriormente analisadas por método visual para determinação da CIM, comparada ao controle positivo.

3.5 Efeito do AE e AE complexado em HP-β-CD sobre biofilmes de *C. albicans*

Biofilmes de *C. albicans* ATCC 18804 foram preparados em placas de microtitulação de 96 poços. Para esse ensaio, suspensões de *Candida* 10⁷ células/ml foram preparadas em solução fisiológico estéril (NaCl 0,9%). Após, 1 ml desse preparado foi adicionado a em 9 ml de caldo RPMI suplementando com 2% de glicose (pH 7,0) e agitado em vórtex. Em seguida, para adesão dos micro-organismos, 200 µl da mistura foi adicionada em triplicata nos poços da placa de microtitulação e incubada por 90 minutos, a 37 °C e 80 rpm. Posteriormente, o meio de cultura foi retirado, os poços lavados com solução fisiológica estéril para retirada de células não aderidas ao fundo da placa. Imediatamente, foi adicionado meio de cultura novo e cultivado biofilme de 24 horas e 48 horas em estufa a 37 °C. O meio de cultura foi renovado após 24 horas. Após, novamente o meio de cultura foi retirado e lavado uma vez com solução fisiológica estéril e tratados com AE e AE/ HP-β-CD 10 vezes a CIM, por 1 minuto, seguido por lavagem com solução fisiológica estéril para remoção do tratamento, suspensão do biofilme, diluição seriada e inoculação em ágar SD

e incubação em estufa, a 37 °C, por 24 horas. Para viabilidade do biofilme foram contadas as UFC do biofilme tratados e não tratados e os valores comparados. O ensaio foi realizado em triplicata em 3 ocasiões diferentes.

3.6 Ensaio da capacidade de infecção de *C. albicans* e avaliação do efeito do AE em modelo *in vivo* de *Drosophila melanogaster*

Neste ensaio *in vivo*, a capacidade de infecção de *Candida* foi analisada em modelo de *Drosophila melanogaster*, obtidas do Centro de Estoque de Bloomington, na Universidade de Indiana, infectadas com *Candida albicans* SC 5314, de acordo com metodologias empregadas por Chamilos et al. (2006) e Glittenberg et al. (2011), com modificações.

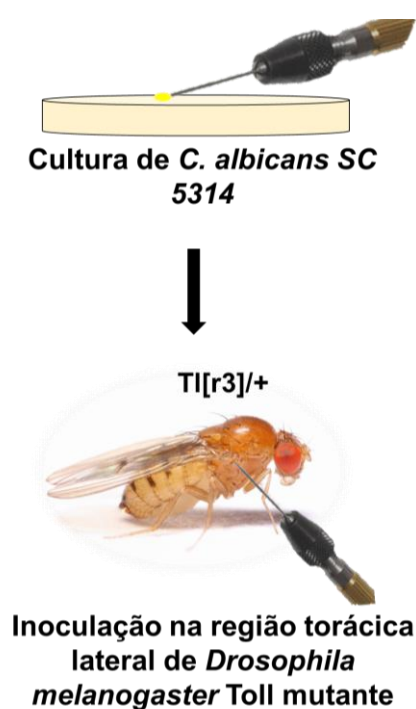
Para a infecção desses animais, *C. albicans* SC 5314 foi cultivada em ágar Sabouraud dextrose por 24 horas e com uma agulha ultrafina de tungstênio foi coletada uma pequena porção da colônia isolada e injetada na região lateral do tórax de *D. melanogaster* (Figura 2).

Para esse ensaio, moscas fêmeas *D. melanogaster* com idade entre 4 a 10 dias heterozigoto Toll mutante Tl[r3]/+, foram cultivadas em garrafas e tubos, contendo meio de cultura padrão com fubá e mantidas a 19 °C, durante todo o experimento. A mosca que apresenta perda de função no alelo Toll, tornam-se mais suscetíveis a fungos (Chamilos et al., 2006).

Inicialmente, para analisar a capacidade de infecção do modelo alternativo, 16 moscas subdivididas em 3 experimentos independentes foram infectadas, cultivadas por 24 horas, maceradas, semeadas em ágar Sabouraud dextrose e feita a análise quantitativa das unidades formadoras de colônia/mosca (UFC/mosca), conforme Miles e Misra (1931) (Figura 3).

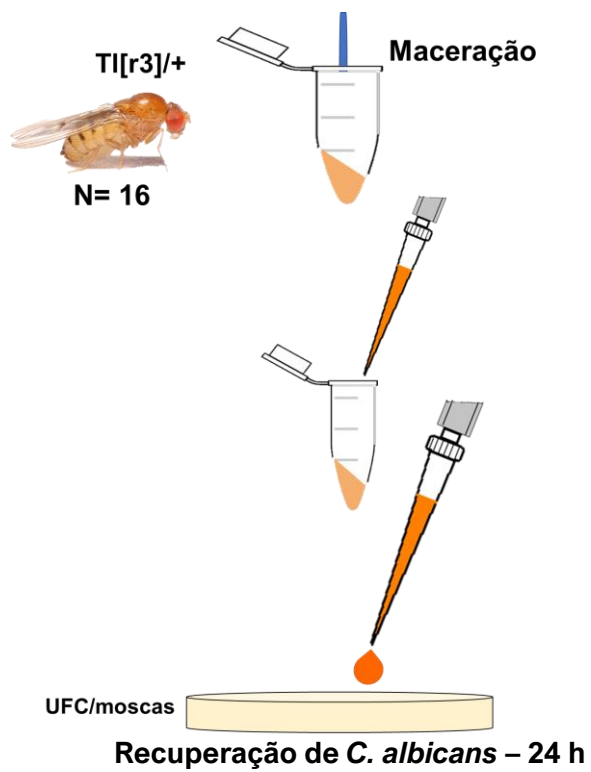
Para a avaliação do efeito protetor (Figura 4), 20 moscas divididas randomicamente foram utilizadas para cada grupo. Solução de AE, anteriormente sonicada por 10 minutos, nas concentrações de 3,2, 6,4, 32 µg/ml (efeito protetor) e 200 µg/ml (toxicidade) foram misturados ao meio base de alimentação das moscas. Previamente, as moscas foram armazenadas em tubos por 6 horas sem alimentação e sucessivamente foram transferidas para tubos com ou sem a substância teste, por 24 horas.

Figura 2 - Inoculação de *C. albicans* SC 5314 na região lateral do tórax de *Drosophila melanogaster*



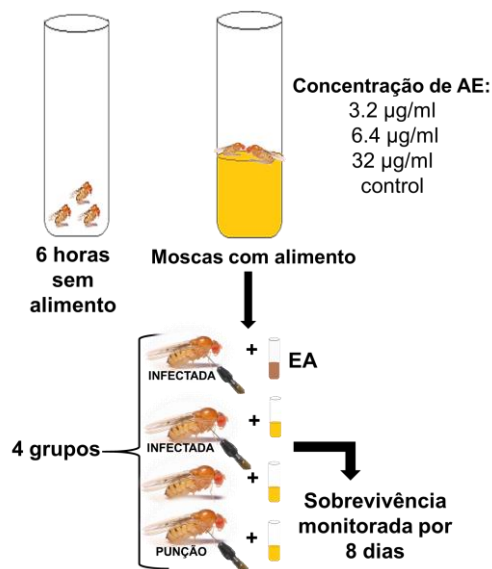
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 3 - Ensaio para comprovação da capacidade de infecção do modelo *Drosophila melanogaster* por *Candida albicans*



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 4 - Ensaio para avaliação do efeito protetor do ácido elágico à infecção por *C. albicans*



Fonte: Elaborada pelo autor.

Na análise do efeito protetor de AE, após 24 horas da transferência das moscas para os tubos novos, as moscas foram infectadas com *C. albicans* e divididas em 4 grupos experimentais; conforme esquema do quadro 1. As moscas que morreram dentro o período de 3 horas após inoculação foram excluídas do estudo. O efeito protetor foi analisado durante 8 dias consecutivos. O número de sobreviventes foi utilizado para a realização de uma curva de sobrevivência. Ambos os testes foram realizados em duplicata, totalizando n= 160 moscas.

Quadro 1 – Grupos experimentais de *Drosophila melanogaster* na avaliação do efeito protetor do ácido elágico à infecção por *Candida albicans*

Grupo	Evento
Tratamento	Moscas inoculadas com <i>C. albicans</i> e alimentadas com meio de cultura contendo AE (3,2, 6,4 e 32 µg/ml).
Controle 1	Moscas inoculadas com <i>C. albicans</i> e alimentadas com meio de cultura regular (sem AE).
Controle 2	Moscas não inoculadas e alimentadas com meio de cultura regular (sem AE).
Controle 3	Moscas não inoculadas, submetida a punção e alimentada a meio de cultura regular (sem AE).

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.7 Avaliação dos efeitos celulares de AE sobre fatores de virulência de *C. albicans* (Prospecção dos mecanismos de ação)

Para estes ensaios foram utilizadas as cepas padrão *C. albicans* SC 5314 e ATCC 18804 tratadas com AE, com o propósito de avaliar o mecanismo de ação antifúngico da substância teste. Todos os testes foram utilizados controle de crescimento, alguns controles positivos e realizados em triplicata em três ocasiões diferentes.

3.7.1 Determinação do efeito sobre a morfologia da célula fúngica

A morfologia celular das células fúngicas pós tratamento foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para esse ensaio, suspensões fúngicas foram preparadas em solução salina (NaCl 0,9%) estéril na concentração de 10^7 UFC/ml de *C. albicans*, em espectrofotômetro (λ : 530 nm). Anteriormente, a solução estoque para o teste foi sonicada por 10 minutos. Em seguida, as suspensões foram expostas ao tratamento com ácido elágico em RPMI, na concentração final de $\frac{1}{2}$ CIM, por 5 minutos. No grupo controle foi utilizado meio sem tratamento.

Após, foi realizado o preparo das amostras para o MEV em lâmina de vidro estéril de tamanho 1x1 cm, padronizado em nosso laboratório. Neste ensaio, foi colocado 3 alíquotas de 10 μ l sobre a lâmina, totalizando uma alíquota de 30 μ l sobre a lâmina, com intervalos de secagem entre cada alíquota. Em seguida, para fixação da amostra, as lâminas foram submersas em glutaraldeído na concentração de 2%, por 24 horas, em temperatura ambiente. Logo após, para o processo de fixação, foi retirado o glutaraldeído e iniciado o processo de desidratação alcoólica em diferentes concentrações. As lâminas foram submersas em etanol 70% e 95%, durante 10 minutos e etanol 100% durante 20 minutos. Após secagem do material, foi realizada a análise em MEV.

3.7.2 Análise do efeito de AE sobre a parede celular fúngica de *C. albicans*

O efeito do AE sobre a parede celular fúngica foi avaliado utilizando o ensaio de proteção por sorbitol, baseado na metodologia empregada por Frost et

al. (1995) e Khan et al. (2013), em que o sorbitol na concentração de 0,8 M atua como osmoprotetor aumentando a viabilidade celular. Desse modo, para analisar danos na parede celular, causado por AE, foi realizado o mesmo procedimento da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de *C. albicans* SC 5314 e ATCC 18804, com meio de cultura contendo caldo RPMI sem a presença de sorbitol e com caldo RPMI na presença de sorbitol, com concentração final de 0,8 M de sorbitol, em placa de microtitulação de 96 poços. Para validar a capacidade do teste em identificar danos na parede celular, foi também realizado, como controle positivo, o ensaio da CIM da caspofungina, antifúngico que tem como alvo a parede celular, baseando-se no documento M27-A3 do CLSI (2008). Ambos os testes foram realizados nas concentrações entre 0,08 a 50 µg/ml. O ensaio foi realizado em triplicata. As leituras dos poços foram realizadas após 2 e 7 dias. A CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento fúngico para a caspofungina e inibir visualmente 80% do crescimento fúngico em AE.

3.7.3 Efeito do AE sobre a biossíntese de ergosterol

Este ensaio, foi realizado com base na metodologia de Rajput e Moran Karuppayil (2013), Arthington Skaggs et al. (1999) e Alizadeth et al. (2017), com modificações. A partir de uma cultura *overnight* de *Candida albicans* ATCC 18804 e SC 5314, uma colônia do micro-organismo foi suspensa em 50 ml de caldo Sabouraud dextrose em Erlenmeyer e incubado a 35 °C, sob agitação por 18 horas. Após as amostras foram centrifugadas a 2700 rpm, por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e lavado uma vez com água destilada estéril. Em seguida, o *pellet* das amostras do grupo tratamento foram expostos

ao tratamento, previamente sonificado em solução estoque por 10 minutos, na concentração final de $\frac{1}{2}$ CIM por 5 minutos, seguida por retirada do tratamento com centrifugação e lavagem, no mesmo parâmetro anterior. Logo após, o peso úmido do *pellet* de ambos os grupos foram determinados e em seguida adicionado alíquotas de 3 ml de KOH a 25% em etanol e agitado por 1 minuto. A suspensão resultante foi transferida para tubos de vidro e mantida em banho maria por 1 hora a 85 °C. Após esfriamento da solução, foi adicionado a mistura na proporção de 1:3 água/hexano e agitado por 3 minutos. A mistura foi deixada em repouso por 24 horas a -20 °C. A camada hexânica foi diluída em etanol 100% e a leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 240 e 300 nm.

Após, foi realizado o cálculo para determinar a % ergosterol, pela fórmula a seguir:

$$\% \text{ ergosterol} + \% 24(28) \text{ DHE} = [\{A_{281.5} / 290\} \times F] / \text{peso do pellet}$$

$$\% 24(28) \text{ DHE} = [\{A_{230} / 518\} \times F] / \text{peso do pellet}$$

$$\% \text{ ergosterol} = [\% \text{ ergosterol} + \% 24(28) \text{ DHE}] - \% 24(28) \text{ DHE}$$

Sendo F referente ao fator de diluição em etanol, 24(28) DHE equivalente ao valor do esteroide intermediário e 290 e 518, os coeficientes de extinção E (em porcentagens por centímetro), determinados pelo ergosterol cristalino e 24(28) DHE. Os ensaios foram realizados em triplicata em 3 ocasiões independente.

3.7.4 Efeito do AE encapsulado sobre a morfogênese de *C. albicans* na transição hifa-levedura

A determinação do efeito do AE sobre a transição hifa-levedura em *C. albicans*, foi realizado conforme metodologia empregado por Chevalier et al. (2012), com modificações. Para o teste cepas de ATCC 18804 e SC 5314, semeadas após 24 horas a 37 °C, em Sabouraud dextrose, foram usadas para o preparo de inóculo na concentração de 10^6 células/ml, em solução salina estéril (NaCl 0,9%). No grupo tratamento, as suspensões foram expostas ao caldo RPMI 1640 (pH 7,0) 2 vezes concentrado, contendo $\frac{1}{2}$ CIM como concentração final, enquanto o grupo controle foi exposto somente ao caldo RPMI 1640 2 vezes concentrado. O experimento foi realizado em placas de 24 poços, em triplicata, na proporção 1:1, com volume final de 1 ml dos preparados e incubados a 37 °C. Após incubação de 4 horas e de 24 horas, foram realizadas contagens de células hifas/pseudohifas e leveduras, em Câmara de Neubauer, e calculado o percentual de filamentação nos grupos tratamento e controle. O experimento foi realizado em triplicata em 3 ocasiões independentes. Todas as soluções testes do tratamento, foram previamente sonicadas na solução estoque por 10 minutos.

A percentagem de filamentação foi determinada conforme fórmula a seguir:

$$\% \text{ filamentação} = \text{número de hifas} \times 100 / \text{número de leveduras} + \text{hifas}$$

3.8 Avaliação do ácido elágico em concentração subinibitória sobre fatores de virulência de *C. albicans*

3.8.1 Ação do AE sobre a produção da enzima fosfolipase

A ação do ácido elágico sobre a produção de fosfolipase foi analisada conforme metodologia descrita por Polak (1992) e Prince et al. (1982), com modificações. Para esse ensaio, meio de cultura contendo 20 g de dextrose, 10 g de peptona, 5 g de extrato de levedura, 58,9 g de cloreto de sódio, 0,55 g de cloreto de cálcio e 20 g de ágar em 840 ml de água destilada, foi preparado e autoclavado. A seguir, foi levado ao banho-maria a 55 °C. Quando a temperatura estabilizou, foi adicionada a emulsão de gema de ovo a 50% (em solução fisiológica esterilizada).

Suspensões padronizadas de *C. albicans* SC 5314 e ATCC 18804 contendo 10^6 células/ml foram preparadas e expostas por 1 hora ao tratamento AE, na concentração de $\frac{1}{2}$ CIM, preparada em caldo RPMI 1640 2 vezes concentrado (pH 7,0), para o grupo tratamento, enquanto no grupo controle, o inóculo foi exposto somente em caldo RPMI de mesma concentração. A exposição aos tratamentos foi realizada em placa de microtitulação de 96 poços, utilizando-se o volume de 100 µl da suspensão para 100 µl do tratamento. As placas foram incubadas a 37 °C em estufa de aerobiose. Posteriormente, alíquotas de 10 µl das suspensões expostas ou não ao tratamento foram inoculadas, em triplicata, no meio base para fosfolipase, em posições equidistantes e incubadas em estufa em câmara úmida, para evitar ressecamento do meio de cultura, por 5 dias a 37 °C. O teste foi realizado em triplicata em 3 ocasiões diferentes. Antes do tratamento, as soluções estoque de AE foram

previamente sonicadas por 10 minutos.

Para leitura dos resultados, os halos de precipitação ao redor da colônia foram medidos. Em seguida foi calculada a razão entre o halo de diâmetro da colônia e do diâmetro da colônia mais o diâmetro da zona de precipitação e expresso em valores de Pz. Os resultados foram expressos conforme classificação quanto a capacidade da ação enzimática, conforme Polak (1992) e descrito no quadro 2.

Quadro 2 – Valores de Pz para produção de fosfolipase e respectiva classificação da atividade enzimática, de acordo com Polak (1992)

Classificação da atividade enzimática (Pz)	
Negativo	Pz =1
Positivo	$0,64 \geq Pz < 1$
Fortemente positiva	$Pz < 0,64$

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.8.2 Ação do AE sobre a produção da enzima proteinase

A ação do ácido elágico sobre a produção de proteinase foi analisada conforme metodologia proposta por Aoki et al. (1990) e Polak (1992). Para esse ensaio, foi preparado solução contendo 2 g de soro albumina bovina (BSA), 11,7 g de extrato de levedura, 2,5 g de polivitamínico (Protovit®), o qual foi esterilizado por filtração. Separadamente foi preparado 18 g de ágar em 100 ml de água destilada, esterilizado em autoclave e mantido em banho maria a 55 °C.

Após estabilização da temperatura, a solução de BSA foi adicionada ao meio de cultura e agitado lentamente. O meio de cultura final foi vertido em placas de Petri estéreis.

Os procedimentos de preparo do inóculo fúngico, tratamentos e tempo de exposição e incubação foram os mesmos dos utilizados para avaliação do efeito sobre a produção de fosfolipase, de acordo com descrito no item 3.8.1. O experimento também foi realizado em triplicata em 3 ocasiões diferentes.

3.8.3 Ação do AE sobre a aderência de células fúngicas *C. albicans* às células epiteliais bucais

Células epiteliais bucais foram obtidas de voluntários saudáveis por raspagem da mucosa jugal utilizando swabs estéreis, conforme metodologia empregada por Wellmer e Bernhardt (1997). As células foram suspensas em solução fisiológica (PBS, pH 7,4), centrifugada a 1500 rpm por 10 minutos, lavadas por 3 vezes e ressuspensa até obter a concentração de 10^5 células/ml utilizando-se câmara de Neubauer.

Suspensões fúngicas de *C. albicans* ATCC 18804, cultivadas por 24 horas foram obtidas na concentração de 10^6 células/ml em PBS estéril (pH 7,4), com auxílio de espectrofotômetro ($\lambda = 530$ nm; D.O.: 0,280), de acordo com Etgeton et al. (2011) e Ellepola et al. (2015). O inóculo na quantidade de 0,5 ml foi exposto a 2 ml do tratamento em ácido elágico a $\frac{1}{2}$ CIM preparado em caldo RPMI 1640 2 vezes concentrado para o grupo tratamento. Para o grupo controle, a suspensão foi exposta em caldo RPMI 1640. As células de *Candida* foram expostas por 1 minuto a 37 °C. Em seguida, centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos, lavadas 2 vezes em PBS estéril e suspenso o *pellet* em 5 ml de PBS.

Para os ensaios de aderência às células epiteliais bucais, 500 µl da suspensão de *Candida* tratada e não tratada foram misturadas separadamente em 500 µl da suspensão de células epiteliais e incubadas a 37 °C, por 1 hora a 80 rpm. Logo após, as suspensões foram centrifugadas em 1500 rpm por 5 minutos, lavadas 2 vezes em PBS, suspensas em 500 µl de PBS e coradas com azul de tripan. Em seguida, a suspensão foi distribuída em lâminas de microscopia e cobertas com lamínula. O número de células fúngicas aderidas a 25 células epiteliais foi obtido, observando-se as lâminas em microscopia de luz com aumento de 400x. O experimento foi realizado em triplicata em 3 ocasiões independentes.

3.9 Avaliação da toxicidade do ácido elágico não encapsulado (AE) e ácido elágico encapsulado em HP-β-CD

3.9.1 Avaliação *in vitro* da citotoxicidade do ácido elágico encapsulado em HP-β-CD

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio colorimétrico com MTT que se baseia na capacidade das células viáveis, transformarem o MTT em cristais de formazan (Riss et al., 2004).

Para o ensaio, foram cultivados fibroblastos da linhagem 3T3 em meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) enriquecido com 10% de soro fetal bovino inativado por calor, suplementado com penicilina/estreptomicina 1% e mantidos em estufa de câmara úmida a 37 °C em atmosfera de 95% de ar e 5% de CO₂. Suspensões de 1x10⁶ células foram semeadas em placas de 96 poços por 24 horas antes da exposição ao tratamento. Posteriormente, o meio de cultura

celular foi removido e as células foram expostas ao AE não encapsulado e ácido elágico encapsulado em HP- β -CD por 24 horas, nas concentrações de 25, 50, 100 e 250 $\mu\text{g/ml}$. Antes do tratamento a solução estoque AE foi sonicada por 10 minutos. O grupo controle foi exposto ao meio de cultura.

Em seguida, foram medidos os valores de absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm (Mosmann, 1983) e determinada a porcentagem de viabilidade celular considerando a absorbância do grupo não tratado como 100%. O experimento foi realizado em triplicata em 2 ocasiões diferentes. Os resultados de viabilidade celular foram classificados conforme Sletten e Dahl, (1999) , sendo considerado levemente citotóxico resultados maior ou igual a 60%, moderadamente citotóxico entre 30 a 60% e altamente citotóxico valores abaixo de 30% de viabilidade celular.

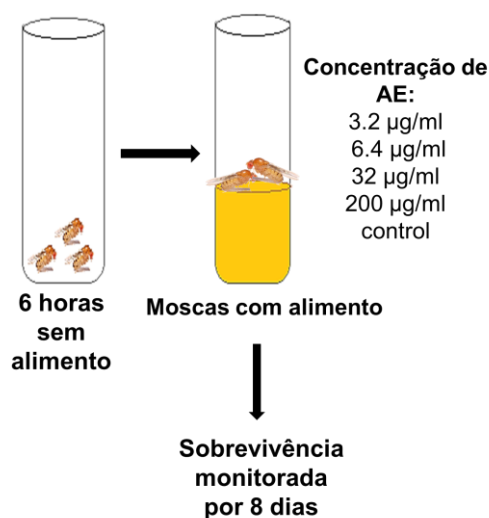
3.9.2 Avaliação da toxicidade de AE em modelo *in vivo* de *Drosophila melanogaster*

Para a avaliação da toxicidade *in vivo* (Figura 5), 60 moscas divididas randomicamente foram utilizadas para cada grupo. Solução de AE, anteriormente sonicada por 10 minutos, nas concentrações de 3,2, 6,4, 32 $\mu\text{g/ml}$ (efeito protetor) e 200 $\mu\text{g/ml}$ (toxicidade) foram misturados ao meio base de alimentação das moscas. Previamente, as moscas foram armazenadas em tubos por 6 horas sem alimentação e sucessivamente foram transferidas para tubos com ou sem a substância teste, por 24 horas. A infecção das moscas foram feitas conforme item 3.6.

As moscas que morreram dentre o período de 3 horas após inoculação foram excluídas do estudo. A toxicidade foi analisada durante 8 dias

consecutivos e anotado o número de sobreviventes para a realização de uma curva de sobrevivência. Ambos os testes foram realizados em duplicata, totalizando n= 240 moscas.

Figura 5 - Ensaio de toxicidade do ácido elágico em *Drosophila melanogaster*



Fonte: Elaborada pelo autor.

3.10 Efeito do AE encapsulado no tratamento de lesões de candidose oral induzida e modelo murino

A metodologia de indução da candidose oral foi baseada em Borges et al. (2018), Rossoni et al. (2015) e Okada et al. (2013). Foram utilizados 60 camundongos (*Mus musculus*) Swiss machos, divididos em 3 grupos: tratados (n=20; tratados com solução contendo ácido elágico complexado em HP- β -CD em concentração 10 vezes CIM), controle (n=20; sem tratamento, administrado solução tamponada estéril PBS) e controle positivo (n=20; tratados com solução

comercial de nistatina 100.000 UI), cada grupo recebeu 100 μ l dos seus respectivos tratamento, durante 3 dias consecutivos. A solução contendo AE/HP- β -CD antes de cada administração foi sonicada por 10 minutos.

Figura 6 - Camundongos em condições usuais de biotério



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os animais foram submetidos a condições usuais de biotério (Figura 6) e água *ad libitum*. Inicialmente foram imunossuprimidos com prednisolona (100 mg/kg peso corporal) com 1 dia antes da infecção experimental por *Candida* e por 5 dias intercalados. Solução de tetraciclina a 0,83 mg/ml foi adicionada à água dos animais 1 dia antes da infecção até o fim do experimento. Os animais foram anestesiados (Figura 7) com injeções intramusculares de solução a base de 10% ketamina (dopalen 0,2 ml/100 gramas de peso corporal) e 2% xilazina (anasedan 0,1 ml/100 gramas do animal).

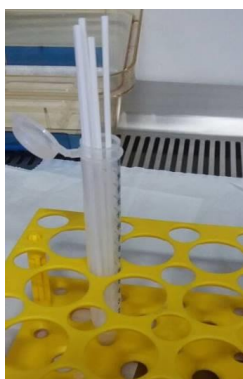
Figura 7 - Animais anestesiados



Fonte: Elaborada pelo autor.

Para a infecção, suspensões de *C. albicans* ATCC 18804 a 10^8 células/ml foram preparadas por espectrofotômetro (λ : 530 nm e D.O.: 1,258), após 24 horas e 72 horas do início do ensaio e em seguida inoculadas na cavidade bucal dos animais por 5 minutos (figura 9), com auxílio de um swab estéril, submerso na suspensão por 5 minutos (figura 8).

Figura 8 - Swabs submersos em suspensão em câmara em fluxo laminar



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 9 - Inoculação de suspensão de *C. albicans* nas línguas dos animais



Fonte: Elaborada pelo autor.

Após 48 horas da inoculação, foi realizado o diagnóstico de candidíase na língua do animal. Animais que adquiriram lesões de candidíase foram submetidos aos tratamentos de acordo com o seu respectivo grupo. O AE/ HP- β -CD administrado foi preparado em tampão fosfato PBS (pH = 7,4). Após 3 e 6 dias do início do tratamento os animais sofreram eutanásia por dose excessiva de anestésico, tiveram a língua removida e submetida a análise microbiológica por maceração e digestão com tripsina, conforme metodologia proposta por Hayama et al. (2012), com modificações. O quadro 3 resume as etapas do experimento.

Quadro 3 - Esquema de realização do experimento *in vivo*

Dias	Eventos
1	Imunossupressão com prednisolona (100 mg/kg peso corporal)
2	Infecção com suspensão de <i>C. albicans</i>
3	Imunossupressão com prednisolona (100 mg/kg peso corporal)
4	Infecção com suspensão de <i>C. albicans</i>
5	Imunossupressão com prednisolona (100 mg/kg peso corporal)
6	Diagnóstico candidose em língua
7	Tratamento 1 e Imunossupressão com prednisolona (100 mg/kg peso corporal)
8	Tratamento 2
9	Tratamento 3 e Imunossupressão com prednisolona (100 mg/kg peso corporal)
10	Eutanásia
11	Nenhum evento realizado
12	Nenhum evento realizado
13	Eutanásia

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para a análise microbiológica, foram selecionados aleatoriamente 6 animais de cada grupo. As línguas foram removidas cirurgicamente, maceradas em solução salina estéril (NaCl 0,9%), submetidas à digestão por tripsina semeadas em ágar Sabouraud dextrose.

Para a análise histopatológica 4 animais de cada grupo tiveram suas línguas removidas, fixadas em solução de formalina 20% e embebidas em parafina. Secções de 5 microns foram obtidas e coradas por PAS (periódico

ácido de Schiff), com a função de analisar o grau de invasão do epitélio lingual por *C. albicans* ATCC 18804 e HE (hematoxilina-eosina), com o objetivo de verificar alterações inflamatórias causadas por *Candida* no epitélio e nas estruturas da mucosa lingual. Para essas investigações, a análise em objetiva de 40 X em microscópio óptico foi feita por um único observador. Foram observados campos histológicos em 2 cortes para cada animal, totalizando 42 campos histológicos. O grau de invasão do epitélio por *Candida* foi classificado conforme os seguintes scores de análise semi-quantitativa: 0: ausência de hifas; 1: 1-5 hifas; 2: 6-15 hifas; 3: 16-50 hifas e 4: mais de 50 hifas (Rossoni et al., 2015).

3.11 Análise estatística

Os dados obtidos nos ensaios foram analisados estatisticamente com auxílio do programa GraphPad Prism versão 7.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Para empregar o teste mais adequado, foi realizado um teste de distribuição amostral, verificando a aderência à curva normal. Posteriormente, foi aplicada a análise adequada para cada resultado. O nível de significância foi estabelecido em 5%.

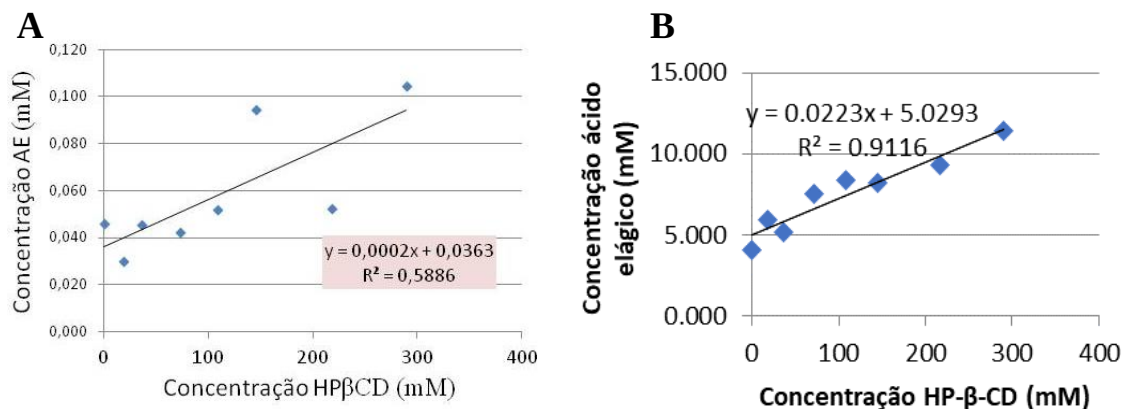
4 RESULTADO

4.1 Complexação do ácido elágico com ciclodextrina e caracterização

4.1.1 Diagrama de solubilidade e secagem por atomização

O perfil do diagrama de fase do complexo ácido elágico/ HP- β -CD indicou a formação de um complexo insolúvel em água, mesmo com aumento da concentração de ácido elágico/ HP- β -CD, não houve um aumento da solubilidade de ácido elágico, não ocorrendo a formação de uma curva de solubilidade linear ($r^2 = 0,588$). Contrariamente, o diagrama de fase indicou a formação de um complexo ácido elágico/ HP- β -CD solúvel em NaOH 0.1M (Figura 10). Os resultados demonstram que o complexo ácido elágico/ HP- β -CD em NaOH apresentam características farmacêuticas mais interessantes, visto que, após a complexação, ocorreu um aumento da solubilidade de ácido elágico em solução aquosa com NaOH 0.1M ($r^2 = 0,9116$), conforme mostra figura 10. A maior solubilidade alcançada foi a de 5 mg/ml de AE com NaOH 0.1M. Com base nesse resultado, as avaliações subsequentes foram realizadas somente com formulações de ácido elágico/ HP- β -CD em solução aquosa em NaOH 0.1M como veículo selecionado para o preparo da solução estoque. A técnica de secagem por atomização para a produção do complexo ácido elágico/ HP- β -CD teve rendimento de 64,8%.

Figura 10 – Diagrama de fase do perfil de solubilidade dos complexos ácido elágico/ HP- β -CD em água (A) e ácido elágico/ HP- β -CD em NaOH (B)



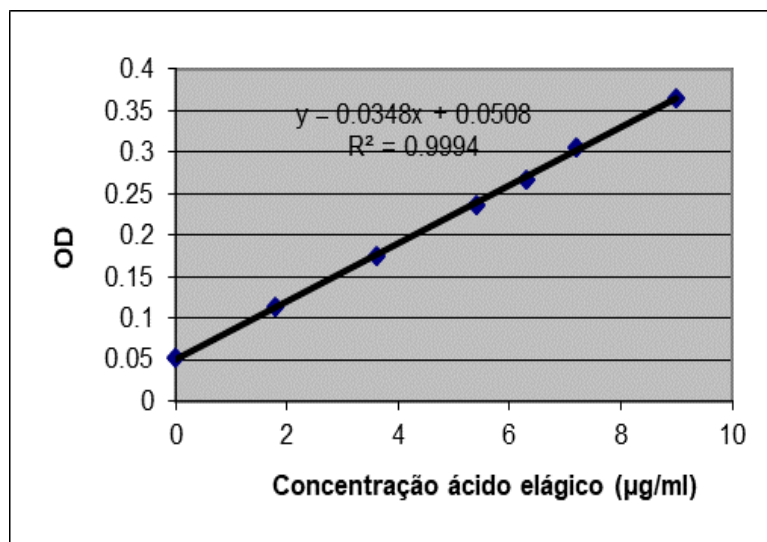
Fonte: Elaborada pelo autor.

A constante de estabilidade para AE/ HP- β -CD em água foi de $K_{1:1}$ (M^{-1}) valor igual a 5,511 com razão molar de 1:5000, enquanto em NaOH 0.1M obteve valor de $K_{1:1}$ (M^{-1}) valor igual 4,535 com razão molar de 1:45.

4.1.2 Avaliação da porcentagem de ácido elágico presente na formulação

A porcentagem de ácido elágico presente na formulação foi quantificada por espectrofotometria em UV a 255 nm (espectrofotômetro Biotek® Synergy TM HT). A curva padrão de calibração (Figura 11) foi linear com R^2 maior que 0.99 e níveis de controle de qualidade ficaram dentro da conformidade. As análises quantitativas demonstraram uma porcentagem média de $15,25 \pm 0,49\%$ para ácido elágico na formulação com HP- β -CD (figura 11)

Figura 11 – Curva de calibração da quantidade de ácido elágico por espectrofotometria UV

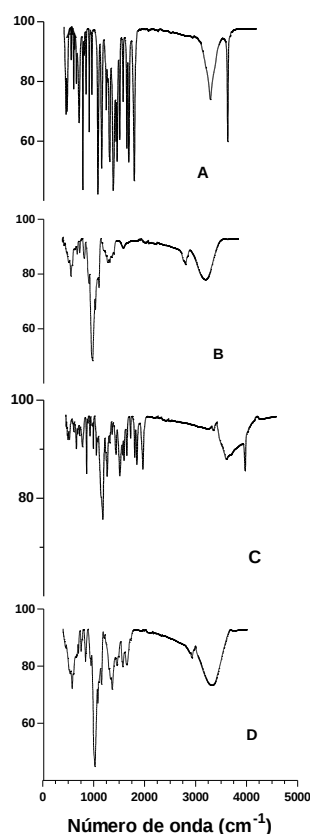


Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.3 Espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os resultados da análise por FTIR podem ser observados na figura 12.

Figura 12 – Gráfico da análise por FTIR do ácido elágico puro (curva A); da HP- β -CD pura (curva B), mistura física (curva C) e do complexo ácido elágico/ HP- β -CD (curva D)



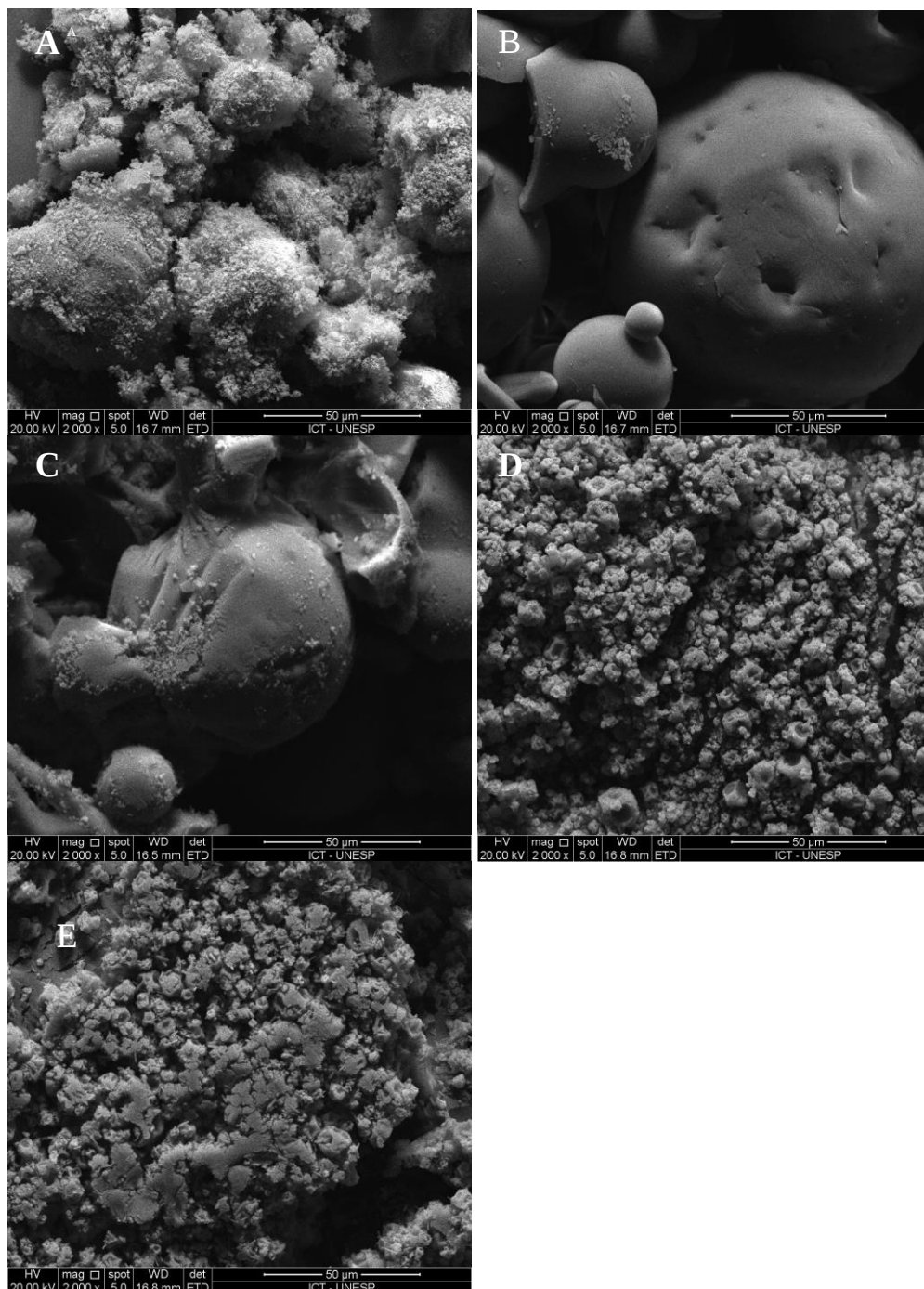
Fonte: Elaborada pelo autor.

O perfil da curva A (ácido elágico não encapsulado) diferenciou-se do perfil das curvas B, C e D (HP- β -CD pura, mistura física e o complexo ácido elágico/ HP- β -CD, respectivamente), sugerindo que houve um processo de complexação entre as moléculas, em razão da mudança em sua estrutura química.

4.1.4 Microscopia eletrônica de varredura

Na análise das imagens captadas por MEV, as micropartículas exibidas na técnica spray-dried (Figura 13d) exibe morfologia diferente da apresentada no ácido elágico não complexado (Figura 13a) e do material puro do conteúdo HP- β -CD (Figura 13b). Estas modificações sugerem a formação do encapsulamento entre o ácido elágico e a ciclodextrina HP- β -CD. Conforme esperado, a morfologia apresentada na mistura física (Figura 13c) demonstra características do ácido elágico e HP- β -CD em suas formas puras. O ácido elágico se apresentou na forma de pó, enquanto a HP- β -CD mostrou no formato esférico.

Figura 13 - Microscopia eletrônica de varredura do ácido elágico puro e 2-hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HP- β -CD)



Legenda: a) AE; b) HP- β ; c) Mistura física, partícula de HP- β -CD (circular); d) Spray dried; e) AE/HP- β -CD. Aumento de 2000 vezes.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2 Teste de suscetibilidade de *C. albicans* frente ao ácido elágico (AE) e de ácido elágico complexado

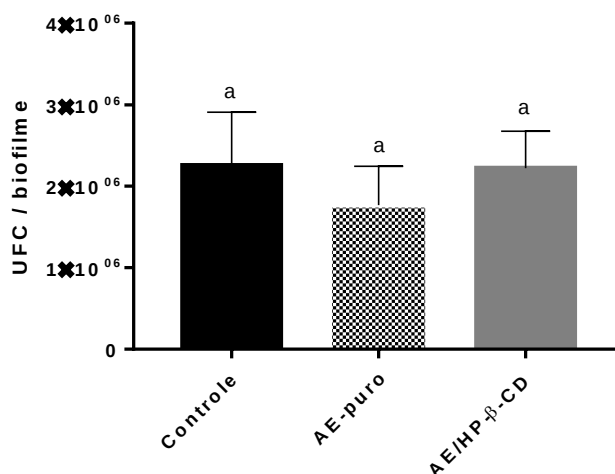
4.2.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em cepas de referência

Dentre as amostras de *C. albicans* avaliadas, as CIMs do ácido elágico (AE) não encapsulado e ácido elágico complexado em ciclodextrina foram de 25 µg/ml para ATCC 18804 e 50 µg/ml para SC 5314. Com base nesses valores, foram consideradas as medidas de ½ CIM para ensaios. Não houve valores de concentração fungicida mínima (CFM), indicando efeito fungistático.

4.3 Efeito do AE e AE complexado em HP-β-CD sobre biofilmes de *C. albicans*

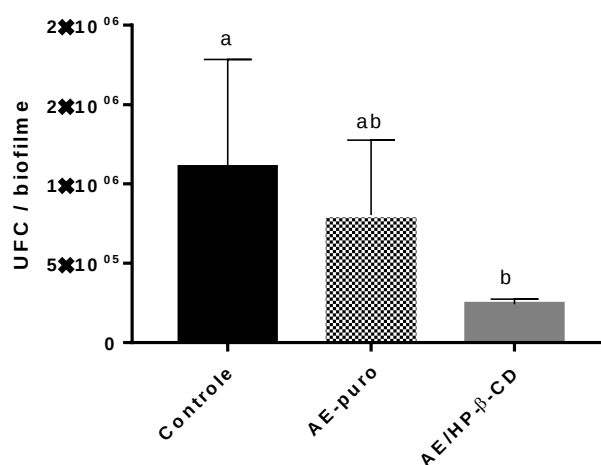
Biofilmes de 24 horas e 48 horas de formados, foram tratados com ácido elágico (AE) puro e ácido elágico complexado em HP-β-CD (AE/ HP-β-CD), por 1 minuto e comparados com grupo controle não exposto. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$) (figura 14), quando foram tratados biofilmes de 24 horas. No entanto, houve redução significativa da viabilidade do biofilme de 48 horas após tratamento com AE/ HP-β-CD, no biofilme de 48 horas ($p = 0,0023$).

Figura 14 – Número de células viáveis (média $\pm$ SD, UFC) em biofilme de 24 horas com grupo controle não tratado e tratados com AE e AE/HP- β -CD 10 vezes a CIM, por 1 minuto



Legenda: Letra iguais indicam que não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$; One-way ANOVA seguido de teste Tukey de múltipla comparação), controle não tratado.
 Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 15 – Número de células viáveis (média $\pm$ SD, UFC) em biofilme de 48 horas com grupo controle não tratado e tratado com AE e AE/HP- β -CD 10 vezes a CIM, por 1 minuto



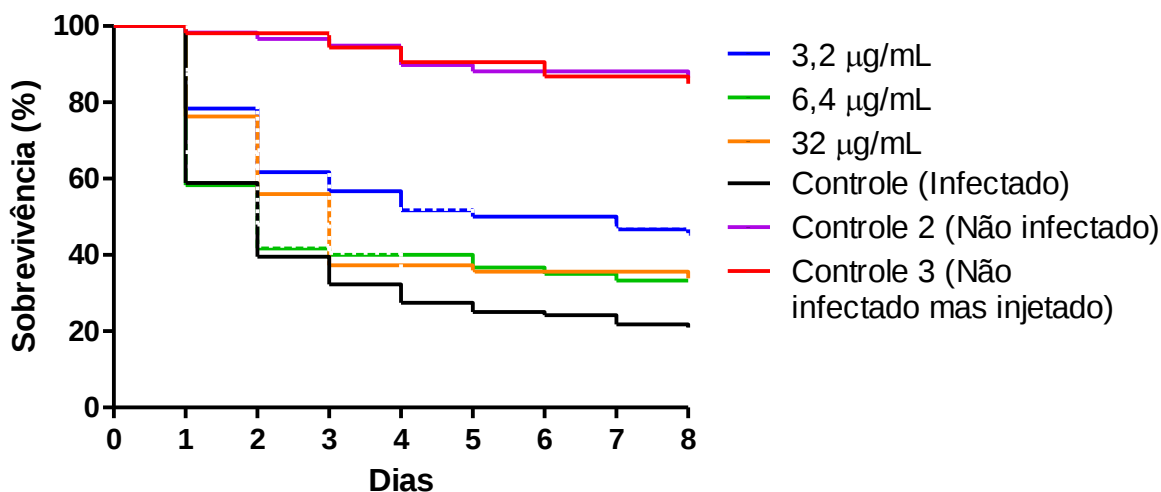
Legenda: Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$; One-way ANOVA; seguido de teste Tukey de múltipla comparação), controle não tratado.
 Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4 Avaliação da atividade antifúngica do AE em modelo *in vivo* de *Drosophila melanogaster*

Houve verificação do ensaio de indução de infecção por *C. albicans* SC 5314 em moscas *Drosophila melanogaster*, com os valores de unidade formadoras de colônia (UFC) recuperado de $6,7 \times 10^4 \pm 1,9 \times 10^4$ UFC/mosca (média $\pm$ desvio padrão da média).

A atividade antifúngica foi analisada e assim avaliado o efeito protetor do AE nas concentrações de 3,2, 6,4 e 32 $\mu\text{g/ml}$, por 8 dias consecutivos. A taxa de sobrevivência mensurada foi de 45, 33 e 34%, respectivamente. Estes dados foram estatisticamente diferentes quando comparados com o grupo controle não infectado que apresentou 21% de sobrevivência ($p < 0,05$). O grupo controle 2 e 3 apresentaram 86 e 85 % de sobrevivência, respectivamente, como indicado pela figura 16.

Figura 16 – Curva de sobrevivência Kaplan-Meier de moscas Toll heterozigotas em ensaio de efeito protetor de AE, em diferentes concentrações e grupos controles



Fonte: Elaborado pelo autor.

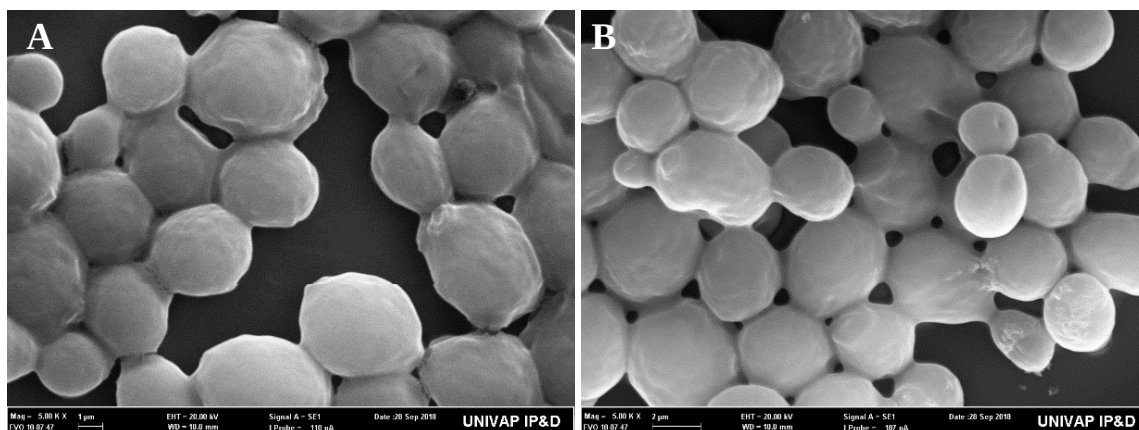
4.5 Avaliação dos efeitos celulares de AE sobre fatores de virulência de *C. albicans* (Prospecção dos mecanismos de ação)

4.5.1 Determinação do efeito de AE sobre a morfologia da célula fúngica

As imagens foram captadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de amostras de *C. albicans* ATCC 18804 e SC 5314 após tratamento por 5 minutos com ácido elágico a $\frac{1}{2}$ CIM. Amostras controle não foram expostas ao tratamento (Figura 17 e 18).

Na análise do MEV, a estrutura de superfície de *C. albicans* ATCC 18804 e SC 5314 pós-tratamento com ácido elágico não apresentou diferença significativa na parede celular quando comparado ao controle.

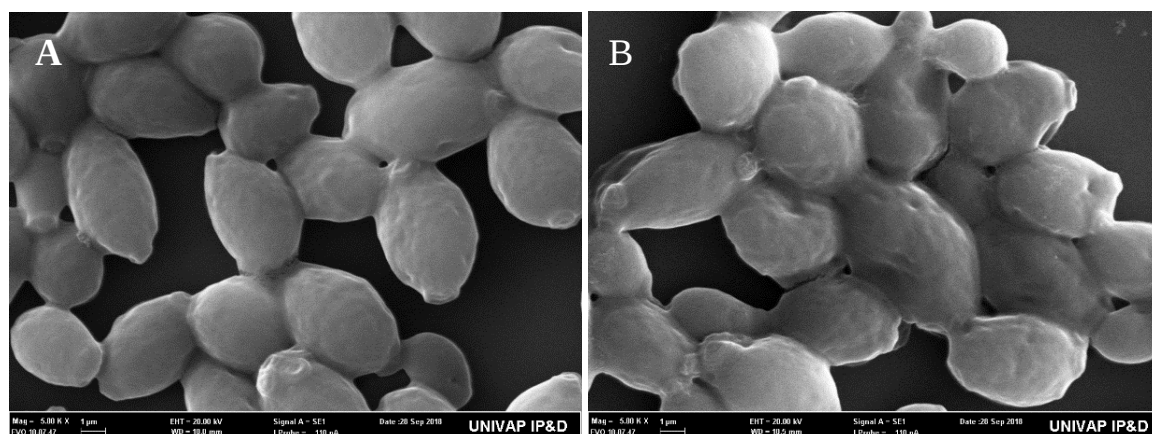
Figura 17 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de célula fúngica *C. albicans* ATCC 18804



Legenda: Microscopia eletrônica de varredura de *C. albicans* ATCC 18804. **A:** grupo controle sem tratamento, **B:** grupo tratamento na concentração de $\frac{1}{2}$ CIM de ácido láctico.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 18 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de célula fúngica *C. albicans* SC 5314



Legenda: Microscopia eletrônica de varredura de *C. albicans* SC 5314. **A:** grupo controle sem tratamento e **B:** grupo tratamento na concentração de $\frac{1}{2}$ CIM de ácido láctico.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.5.2 Análise do efeito de AE sobre a parede celular fúngica de *C. albicans*

O teste de proteção pelo sorbitol, após exposição ao AE por 2 dias, foi positivo apenas para *C. albicans* ATCC 18804. No entanto, a redução foi de uma diluição (de 50 µg/ml para 25µg/ml). A CIM na presença de sorbitol foi maior do que sua ausência. (Quadro 4). No entanto, na análise após 7 dias de incubação as concentrações foram similares em meio contendo ou não o sorbitol.

Na análise do grupo controle com caspofungina, o ensaio após 2 dias com *C. albicans* ATCC 18804, não apresentou diferença nas concentrações de CIM na presença ou ausência de sorbitol. No entanto, em *C. albicans* SC5314 foi positivo com valores de CIM maiores na presença de sorbitol (de 0,78 µg/ml para 0,39 µg/ml). Na análise após 7 dias de incubação, ambas as cepas apresentaram maiores valores na presença de sorbitol, que na ausência, conforme indicado no Quadro 4.

Quadro 4 – Concentração inibitória mínima de ácido elágico e caspofungina (µg/ml) na presença e ausência de sorbitol (0,8 M), sobre *C. albicans* ATCC 18804 e SC 5314

	2 dias		7 dias	
Ácido elágico	+ Sorbitol	- Sorbitol	+ Sorbitol	- Sorbitol
<i>C. albicans</i> ATCC 18804	50	25	50	50
<i>C. albicans</i> 5314	50	50	50	50
Caspofungina				
<i>C. albicans</i> ATCC 18804	0,78	0,78	6,2	0,78
<i>C. albicans</i> 5314	0,78	0,39	6,2	0,78

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.5.3 Efeito do AE sobre biossíntese de ergosterol de membrana

A quantificação do ergosterol presente na membrana fúngica foi analisada em cepas de *C. albicans* ATCC 18804 e SC 5314 tratadas com AE ½ CIM.

Conforme pode ser observado na tabela 1, não foi detectada diferença significativa na presença de ergosterol após tratamento com ácido elágico em *C. albicans* ATCC 18804 ($p = 0,1325$, test t). Contrariamente, em *C. albicans* SC 5314 ($p = 0,0483$; teste Mann-Whitney) tratadas com ácido elágico a ½ CIM, foi

notado diferença estatisticamente significativa comparado ao controle sem tratamento.

Tabela 1 – Quantificação do ergosterol de membrana liberado ao meio após exposição ao ácido elágico (AE) a ½ CIM

	<i>C. albicans</i> 18804	<i>C. albicans</i> 5314
AE	0,04 ± 0,01 %	0,05 ± 0,01 %*
Controle negativo	0,05 ± 0,01 %	0,03 ± 0,01 %

Legenda: Média do conteúdo de ergosterol apresentado como porcentagem em relação ao peso úmido do pellet ± desvio-padrão. Controle negativo não exposto ao tratamento.

*Significante em relação ao controle (p = 0,04 Teste Mann-Whitney).

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.5.4 Efeito do AE sobre a morfogênese de *C. albicans* na transição hifa-levedura

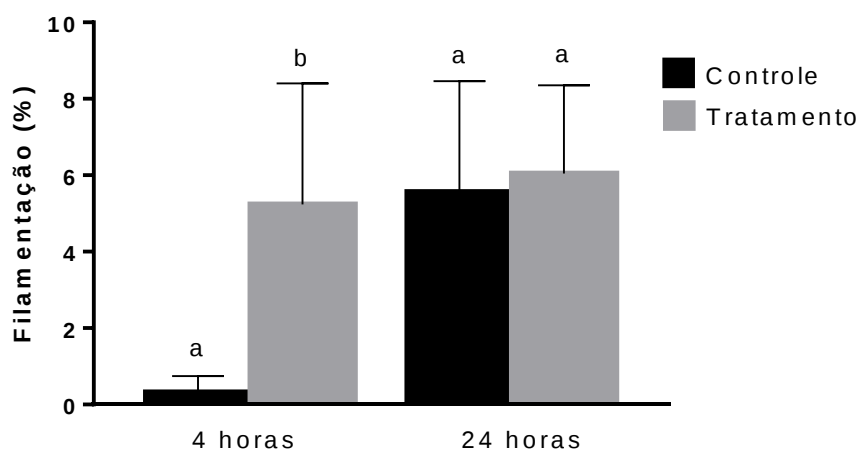
Suspensões de *C. albicans* ATCC 18804 expostas ao ácido elágico e mantidos a 37 °C por 4 horas, apresentaram 5% das células na forma filamentosa (hifa). No entanto, o controle negativo apresentou 0,32% de filamentação (Figura 19).

As suspensões de *C. albicans* SC 5314 expostas ao ácido elágico por 4 horas de incubação apresentaram 21,56% de filamentação no tratado. O controle sem tratamento apresentou 22,92% de filamentação (Figura 20). Foi possível observar um aumento de filamentação estatisticamente significativo após 4 horas de incubação em *C. albicans* ATCC 18804 (p = 0,0016; teste t com correção

Welch), enquanto para *C. albicans* SC 5314 não houve diferença estatisticamente significativa no tempo de 4 horas ($p = 0,9310$; teste t com correção Welch).

Após as 24 horas de incubação, ambas as cepas não tiveram o percentual de filamentação significativamente reduzido na presença de ácido elágico a $\frac{1}{2}$ CIM.

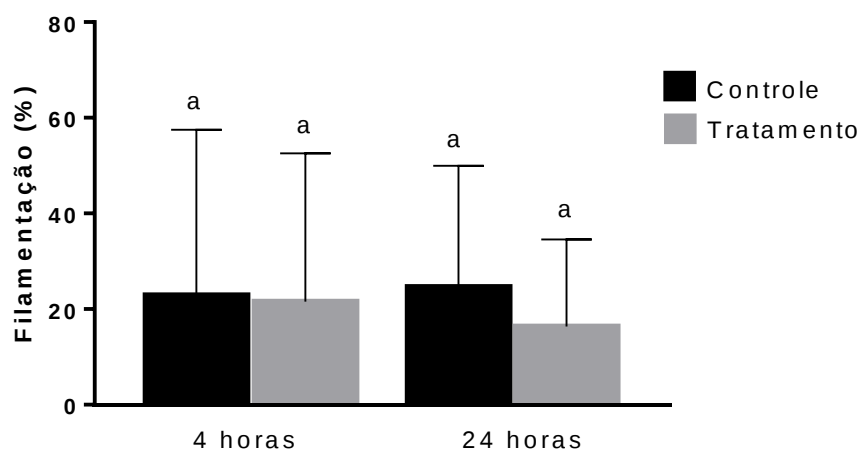
Figura 19 – Porcentagem de filamentação de suspensões de *C. albicans* ATCC 18804 expostas ao ácido elágico em $\frac{1}{2}$ CIM em RPMI 1640



Legenda: Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significante ($p = 0,001$; teste t com correção Welch) em 4 horas. Em 24 horas, letras iguais, indicam que não houve diferença estatisticamente significante ($p = 0,70$; teste t com correção Welch).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 20 – Porcentagem de filamentação de suspensões de *C. albicans* SC 5314 expostas ao ácido elágico em ½ CIM em RPMI 1640



Legenda: Letras iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa (Em 4 horas, $p = 0,93$; em 24 horas, $p = 0,43$; test t com correção Welch).

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.6 Avaliação de AE em concentração subinibitória sobre fatores de virulência de *C. albicans*

4.6.1 Ação do AE sobre a produção da enzima fosfolipase

C. albicans ATCC 18804 e SC 5314 expostas ao AE, por 1 hora, apresentaram presença de halo em torno da colônia, demonstrando atividade de liberação de fosfolipase extracelular e exibiram atividade enzimática fortemente positiva ou positiva. Esses resultados indicam que o tratamento testado não afetou a atividade da enzima estudada. A tabela 2 mostra as médias de Pz de *Candidas* tratadas e não tratadas com ácido elágico e suas respectivas atividades enzimáticas.

Tabela 2 – Atividade enzimática de *C. albicans* sobre a produção da enzima fosfolipase

Médias	<i>C. albicans</i> ATCC 18804	Atividade enzimática	<i>C. albicans</i> SC 5314	Atividade Enzimática
Média Pz – sem tratamento	Pz = 0,58 ± 0,09	Fortemente positivo	Pz = 0,63 ± 0,06	Fortemente positivo
Média Pz – Tratada com AE	Pz = 0,56 ± 0,11	Fortemente positivo	Pz = 0,68 ± 0,06	Positivo

Legenda: Média dos valores de Pz obtidos de cepas testadas em triplicata em 3 ocasiões diferentes, seguido por ± valores de desvio padrão.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.6.2 Ação do AE sobre a produção da enzima proteinase

C. albicans ATCC 18804 e SC 5314 expostas ao AE, por 1 hora, apresentaram presença de halo em torno da colônia, demonstrando atividade enzimática para a proteinase, e exibiram atividade enzimática positivo e fortemente positiva, respectivamente. Conforme a tabela 3, os resultados indicam que o tratamento testado não afetou a atividade da enzima estudada. A tabela 3 mostra as médias de Pz de *C. albicans* tratadas e não tratadas com ácido elágico e suas respectivas atividades enzimáticas.

Tabela 3 – Atividade enzimática de *C. albicans* sobre a produção da enzima proteinase

Médias	<i>C. albicans</i> ATCC 18804	Atividade enzimática	<i>C. albicans</i> SC 5314	Atividade Enzimática
Média Pz – sem tratamento	Pz = 0,72 ± 0,09	Positivo	Pz = 0,39 ± 0,11	Fortemente positivo
Média Pz – Tratada com AE	Pz = 0,73 ± 0,11	Positivo	Pz = 0,30 ± 0,14	Fortemente positivo

Legenda: Média dos valores de Pz obtidos de cepas testadas em triplicata em 3 ocasiões diferentes. ± desvio padrão.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.6.3 Ação do AE sobre a aderência de células fúngicas *C. albicans* às células epiteliais bucais

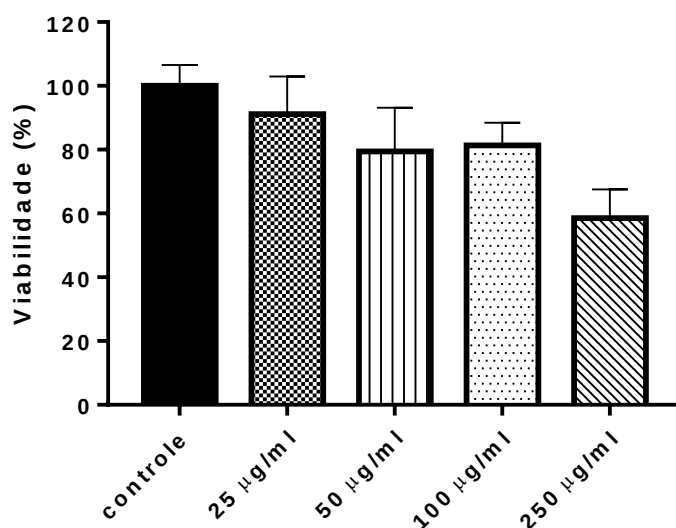
A avaliação da ação do ácido elágico sobre a aderência de *C. albicans* 18804 às células epiteliais após exposição por 1 minuto, apresentou mediana de número 1 tanto para o grupo tratamento quanto para o grupo controle. Esse resultado indica que as leveduras apresentaram mesmo potencial de aderência as células epiteliais, quando comparado o grupo tratamento com o controle sem tratamento e não houve diferença significativa ($p = 0,2049$; Mann-Whitney). Os resultados sugerem que ½ CIM de AE não afetou a capacidade de aderência de *C. albicans* ATCC 18804.

4.7 Avaliação da toxicidade do ácido elágico

4.7.1 Avaliação *in vitro* da citotoxicidade do ácido elágico não complexado e complexado em HP- β -CD

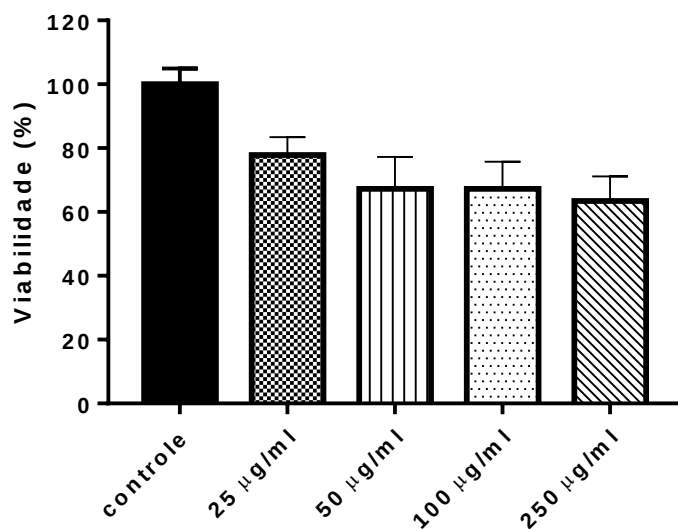
A exposição ao ácido elágico não complexado a 250 $\mu\text{g/ml}$ (10 vezes a CIM) resultou em 58% de viabilidade celular, sendo considerado moderadamente citotóxico. Para o ácido elágico complexado em mesma concentração este valor foi de 63%, sendo assim classificado como levemente citotóxico, conforme ilustram as figuras 21 e 22. Em contraste, a concentração de 25 $\mu\text{g/ml}$ (CIM) de ácido elágico não complexado e complexado em HP- β -CD apresentou baixa toxicidade, com viabilidade celular de 100%.

Figura 21 – Viabilidade celular dos grupos controle e expostos ao ácido elágico não complexado nas concentrações de 25, 50, 100 e 250 $\mu\text{g/ml}$



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 22 – Viabilidade celular nos grupos controle e expostos a concentrações de 25, 50, 100 e 250 µg/ml do ácido elágico complexado em HP-β-CD

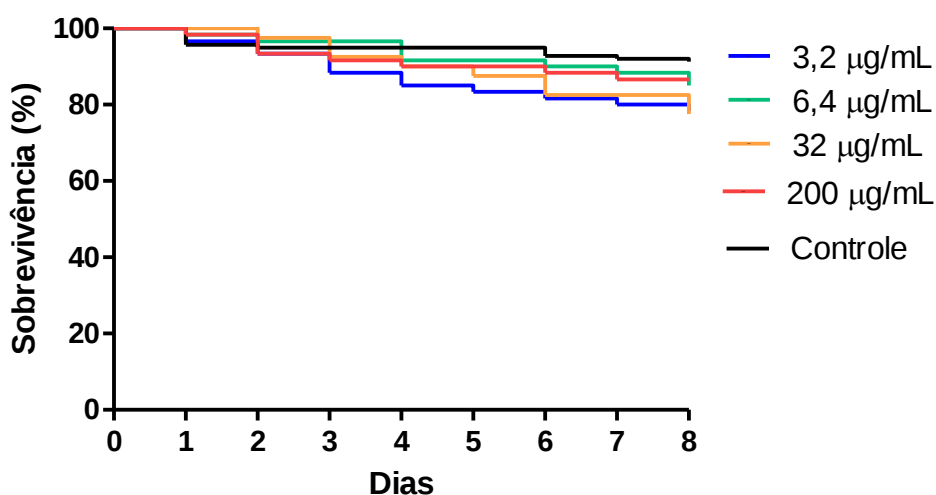


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.7.2 Teste de toxicidade de ácido elágico (AE) em modelo de *Drosophila melanogaster*

No ensaio de toxicidade do AE, os grupos com concentrações de 3,2, 6,4, 32 e 200 µg/ml e controle obtiveram curva de sobrevivência de 78, 85, 77,5, 87 e 91% de sobrevivência, respectivamente, conforme apresenta figura 23. Os resultados sugerem baixa toxicidade em nenhuma das concentrações testadas, quando comparada a curva de sobrevivência do grupo controle sem tratamento ($p = 0,0936$).

Figura 23 – Curva de sobrevivência Kaplan-Meier de moscas Toll heterozigotas alimentadas em meio regular contendo AE em diferentes concentrações e grupo controle sem AE, em ensaio de toxicidade



Fonte: Elaborado pelo autor.

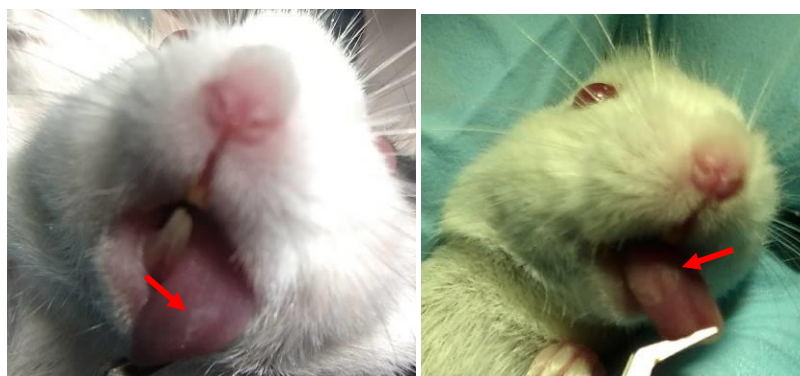
4.8 Efeito do AE encapsulado no tratamento de lesões de candidose oral induzida em modelo murino

4.8.1 Análise histopatológica

Com base nos resultados obtidos nos ensaios *in vitro*, no qual o ácido elágico complexado com HP-β-CD apresentou ação de atividade antifúngica contra *C. albicans* e baixa citotoxicidade em ensaio *in vivo* com moscas *Drosophila melanogaster*, em que o ácido elágico puro apresentou efeito protetor e baixa toxicidade, o ácido elágico complexado com HP-β-CD (AE/HP-β-CD) na concentração de 250 µg/ml foi utilizado para o tratamento de lesões de candidose bucal induzida em modelo murino.

Após 48 horas da inoculação de *C. albicans* ATCC 18804 foi realizado o diagnóstico de candidose induzida na língua dos animais e comprovada as lesões bucais, conforme apontado nas figuras 24.

Figura 24 – Lesão de candidose induzida na língua de murinos



Fonte: Elaborado pelo autor.

Cortes histológico corados com HE (Hematoxilina/ eosina) foram visualizados em microscópio óptico (Carl Zeiss) em aumento de 200 e 400 vezes.

Os cortes histológicos da mucosa lingual do grupo controle não tratado, cujos animais foram sacrificados em 24 horas, apresentaram epitélio pavimentoso estratificado hiper-queratinizado com alongamento das papilas linguais, duplicação da camada basal e espongiose. Também foi observado notável presença de exocitose em toda a extensão do epitélio lingual. O tecido conjuntivo estava ocupado por intenso infiltrado inflamatório predominantemente linfocitário e plasmocitário, com a presença de raros polimorfonucleares. O conjuntivo denso ainda apresentou diversos pequenos vasos sanguíneos sendo que alguns vasos volumosos preenchidos por intensos infiltrados inflamatório mononuclear.

Na análise histológica da mucosa lingual dos animais do grupo controle

48 horas, foi possível visualizar as características histopatológicas clássicas de candidose oral. O epitélio de recobrimento apresentou recobrimento hiperqueratinizado com retificação das papilas linguais e presença de micro abscessos intra-epiteliais. Adicionalmente, notou-se importante espongiose, múltiplas áreas de exocitose e duplicação da camada basal. O tecido conjuntivo que sustenta esse epitélio, apresentou intenso infiltrado inflamatório mononuclear que se estende até a profundidade do tecido. Também foi possível notar numerosos pequenos vasos sanguíneos congestos dispersos pelo tecido de suporte.

Os cortes histológicos da mucosa lingual dos animais do grupo ácido elágico complexado em HP- β -CD 24 horas após o último tratamento apresentaram característica típica de candidose provavelmente amenizados pelo tratamento com ácido elágico encapsulado (AE/ HP- β -CD). O epitélio pavimentoso estratificado especializado mostra-se hiper-queratinizado, com papilas linguais de morfologia preservada. As células epiteliais não apresentaram alterações inflamatórias celulares individuais. Na região próxima à camada basal, é possível notar algumas áreas de espongiose. A camada basal apresentou áreas de duplicação e por todo o epitélio pode-se notar esparsas exocitoses. Em alguns cortes, percebe-se o início da formação de abscesso intra-epitelial que não se consolidou. O tecido conjuntivo estava permeado por moderado infiltrado inflamatório mononuclear que se difunde até a camada muscular. Na região sub epiteliais foi marcante a presença de plasmócitos.

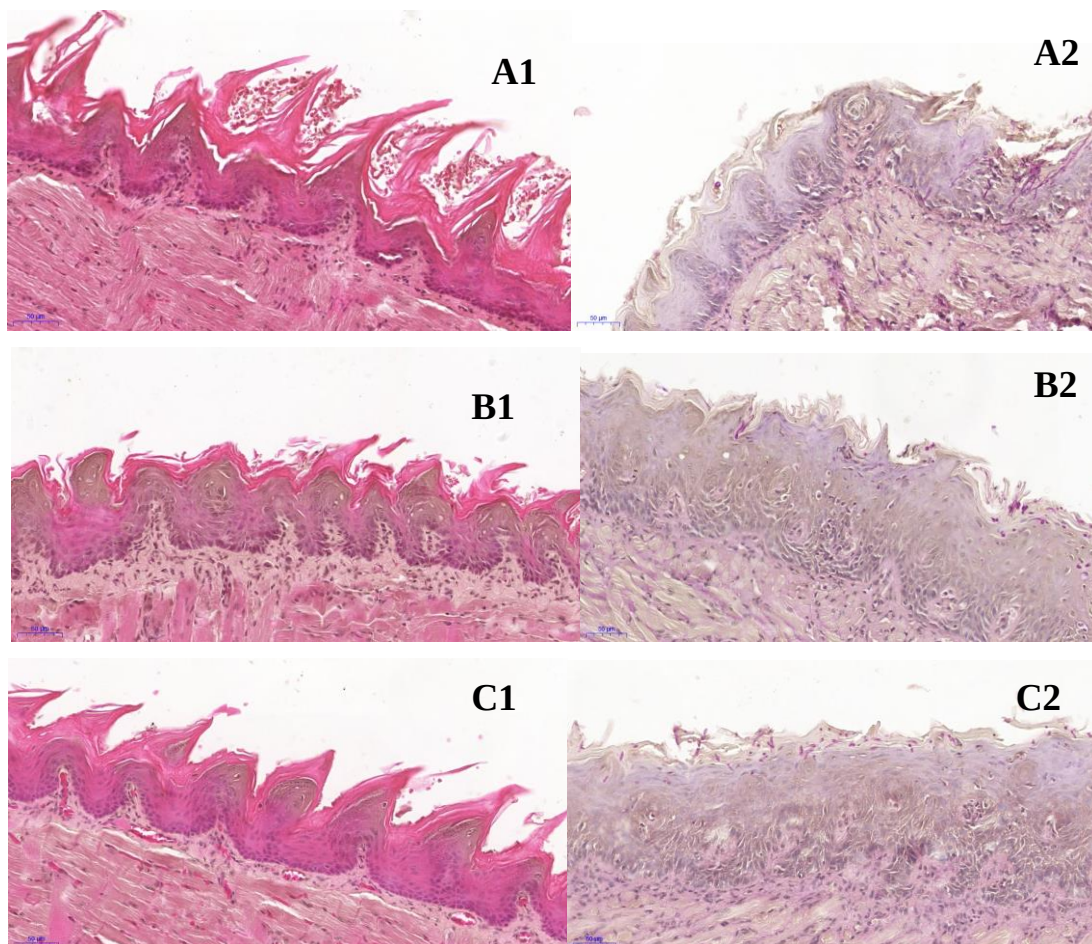
Nos cortes histológicos da mucosa lingual do grupo ácido elágico complexado em HP- β -CD 48 horas, o quadro histopatológico das lâminas analisadas mostrou-se similar ao grupo ácido elágico complexado em HP- β -CD 24 horas. Com características relacionadas à candidose, porém mais brandas. Tanto as alterações inflamatórias linfo-plasmocitário, se fizeram presentes, porém todos os sinais foram mais brandos. Em alguns cortes, inclusive,

podemos notar abscesso intra-epitelial, porém esse se mostrou geralmente pequeno e restrito à superfície do epitélio, diferentemente do que ocorre no grupo controle. Comparando-se os grupos ácido elágico complexado em HP- β -CD entre si, não houve qualquer diferença histológica marcante entre ambos.

Os cortes histológicos do grupo nistatina 24 horas, não apresentaram qualquer diferença digna de nota entre os grupos nistatina 24 horas e 48 horas, sendo que as características histopatológicas dos fragmentos de mucosa analisados foram extremamente semelhantes.

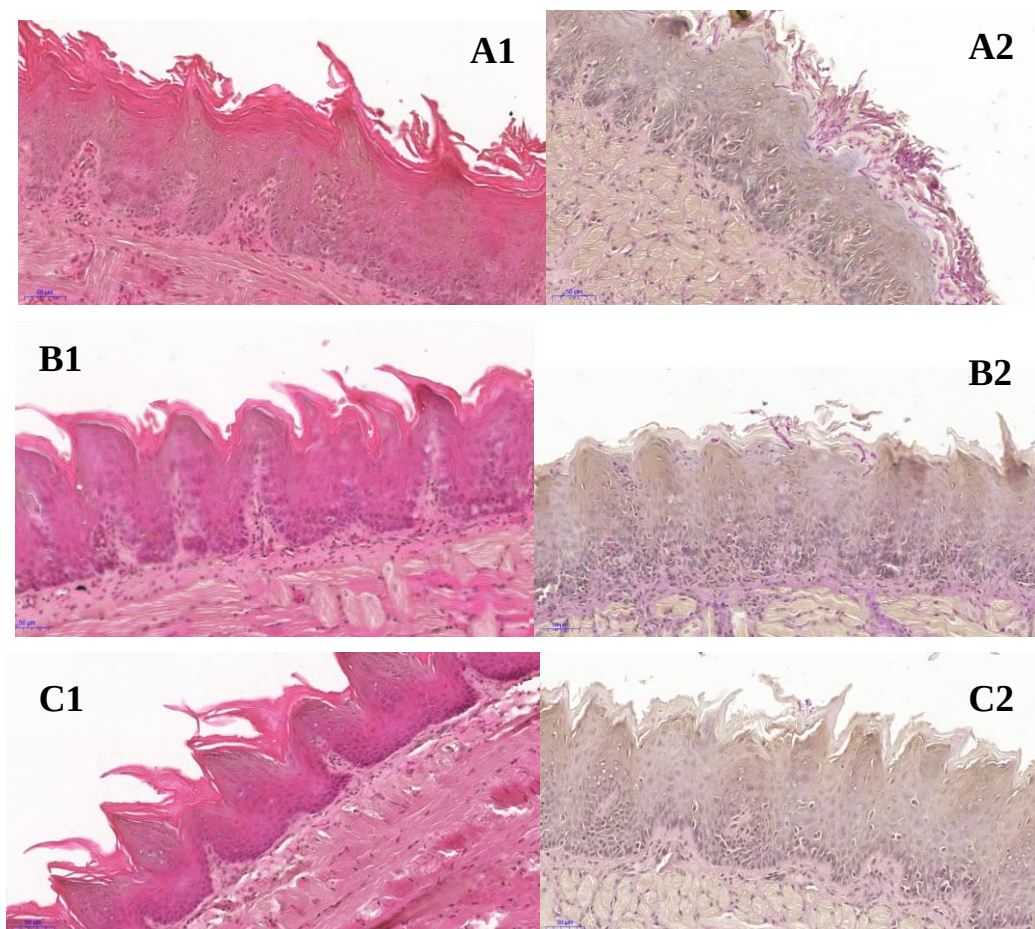
Em todos os grupos de estudos analisados, independentemente da intensidade das manifestações da candidose oral, os tecidos anexos ao conjuntivo: tecido muscular, adiposo e glandular, tinham suas características preservadas.

Figura 25 – Cortes histológicos corados por HE (1) e PAS (2) nos grupos de estudo eutanasiados após 24 horas do tratamento, no aumento de 400 vezes



Legenda: **A1** e **A2**: Grupo controle não tratado, **B1** e **B2**: Grupo tratamento com ácido elágico complexado em HP- β -CD (AE/ HP- β -CD), **C1** e **C2**: Grupo tratamento com nistatina.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 26 – Cortes histológicos corados por HE (1) e PAS (2) nos grupos de estudo eutanasiados após 48 horas do tratamento, com aumento de 400 vezes

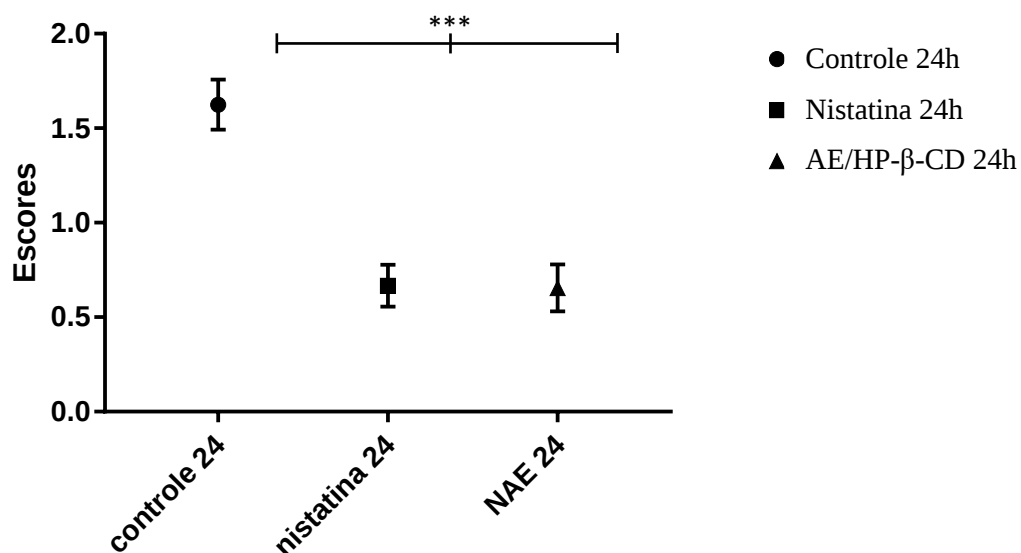


Legenda: **A1** e **A2**: Grupo controle não tratado, **B1** e **B2**: Grupo tratamento com ácido elágico complexado em HP- β -CD (AE/ HP- β -CD), **C1** e **C2**: Grupo tratamento com nistatina.
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.8.2 Contagem de hifas de *C. albicans* invadindo o epitélio

Aos cortes corados com PAS (Periódico Ácido de Schiff), foram atribuídos scores conforme a quantidade de hifas invadindo o epitélio (Figura 27 e 28). Foram obtidos scores de 42 campos analisados em cada animal 24 horas após o último tratamento. No grupo não tratado foi possível observar que 3 animais apresentaram uma mediana igual a 2, enquanto que o grupo tratado com nistatina e ácido elágico complexado tiveram medianas de escore similares, sendo 1 o valor máximo observado (Figura 27).

Figura 27 – Escores correspondentes a 42 campos histológicos analisados em cada animal dos grupos experimentais eutanasiados 24 horas após o último tratamento



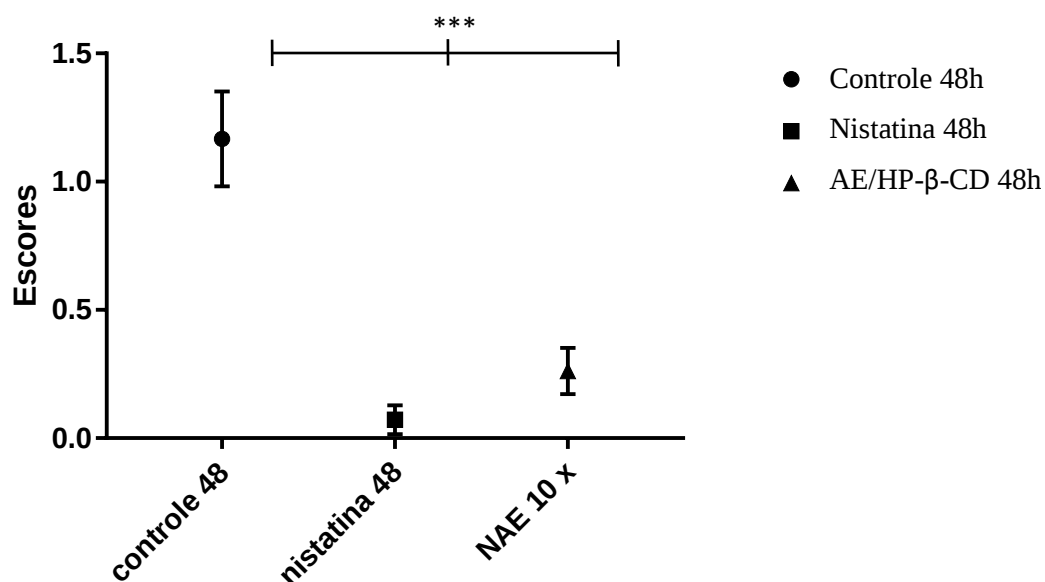
Legenda: Escores analisados entre controle (não tratado), nistatina e ácido elágico complexado em HP- β -CD eutanasiados 24 horas após o último tratamento.

*** Diferença estatisticamente significativa comparada com o controle ($p < 0,0001$; teste Kruskal Wallis e Dunn).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Analisando escores obtidos para 48 horas após o tratamento, observa-se que no grupo não tratado foram obtidos escores medianos de 2, 1, 0,5 e 0. Nos grupos nistatina e ácido elágico complexado em HP- β -CD os escores medianos foram iguais a zero (Figura 28).

Figura 28 – Escores correspondentes a 42 campos histológicos analisados em cada animal dos grupos experimentais eutanasiados 48 horas após o último tratamento



Legenda: Escores analisados entre controle (não tratado), nistatina e ácido elágico complexado em HP- β -CD eutanasiados 48 horas após o último tratamento.

*** Diferença estatisticamente significativa comparada com o controle ($p < 0,0001$; teste Kruskal Wallis e Dunn).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nos cortes corados com PAS nos grupos não tratados, tratados com ácido elágico encapsulado e com nistatina, dos animais eutanasiados 24 horas após o tratamento, Observou-se que no grupo não tratado existe grande quantidade de hifas penetrando o epitélio. Nos grupos tratados com ácido elágico encapsulado e nistatina, observa-se redução significativa da quantidade

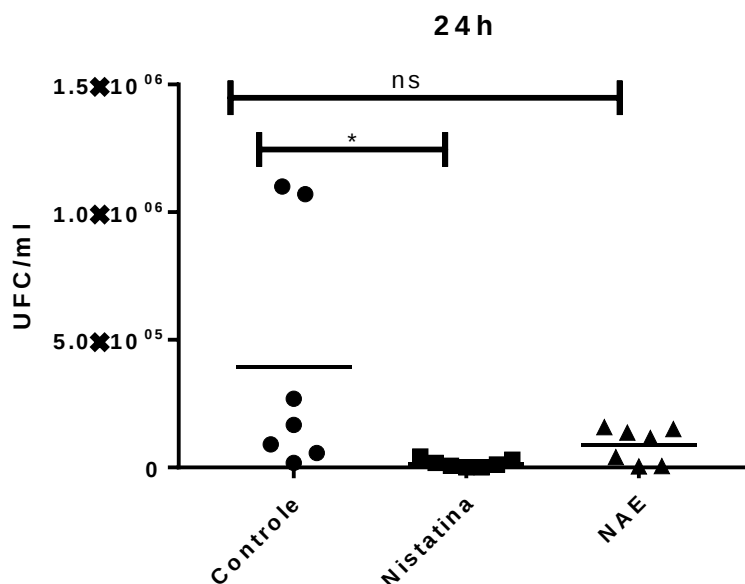
de hifas invadindo o tecido.

Os cortes histológicos corados por PAS nos grupos experimentais dos animais eutanasiados 48 horas após o tratamento. Observa-se menor presença de hifas penetrando o epitélio comparado com o grupo 24 horas. Nos grupos tratados com AE encapsulado e nistatina, observa-se menor quantidade de hifas em relação ao controle não tratado.

4.8.3 Análise microbiológica

A análise microbiológica da língua realizada através da contagem de UFC/ml dos grupos submetidos a eutanásia após 24 horas do último tratamento mostraram diferença significativa entre o grupo controle e grupo nistatina enquanto o grupo controle e o grupo tratado com ácido elágico complexado com HP- β -CD não houve diferença estatística significante ($p = 0,0085$; One-way ANOVA, Kruskal-Wallis test), Conforme pode ser observado na figura 29.

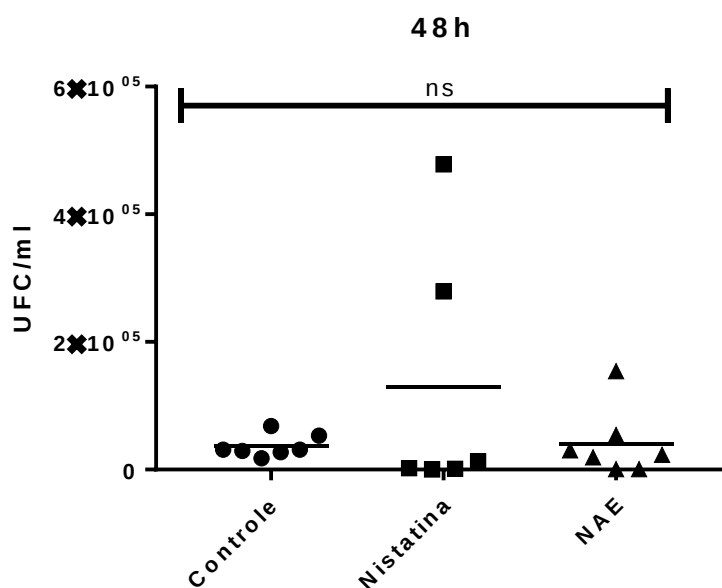
Figura 29 – Contagem de UFC na língua de animais após 24 horas de tratamento com nistatina e ácido elágico complexado em HP- β -CD



Legenda: * Diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0102$; One-way ANOVA, seguido de teste Kruskal-Wallis de múltipla comparação). ns (não significativo): Não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$; One-way ANOVA, seguido de teste Kruskal-Wallis de múltipla comparação).
Fonte: Elaborado pelo autor.

A análise microbiológica da língua de animais eutanasiados após 48 horas do último tratamento também foi analisado por contagem de UFC/ml e não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,5724$; One-way ANOVA, Kruskal-Wallis test), conforme pode ser visualizado na figura 30.

Figura 30 – Contagem de UFC na língua de animais após 48 horas de tratamento com nistatina e ácido elágico complexado em HP- β -CD



Legenda: ns (não significativo): Diferença estatística não significativa ($p = 0,5724$; One-way ANOVA, seguido de Teste Kruskal-Wallis de múltipla comparação).

Fonte: Elaborado pelo autor.

5 DISCUSSÃO

Estudos anteriores indicam ação inibitória promissora do ácido elágico sobre *Candida albicans* (Lourenção Brighenti et al., 2017). Porém, os mecanismos de ação e dos efeitos sobre fatores de virulência deste composto em *C. albicans* ainda não estão elucidados. Assim, o presente estudo avaliou a atividade do ácido elágico frente *C. albicans* em cultura planctônica e biofilme, em modelo *in vitro* e *in vivo*, investigou a ação do ácido elágico sobre fatores de virulência e prospectou possíveis alvos da ação antifúngica. Foram também realizados estudos de toxicidade *in vitro* e *in vivo*.

No presente trabalho, observou-se CIM de 25 µg/ml para *C. albicans* ATCC 18804 e 50 µg/ml para *C. albicans* SC 5314. Estes resultados estão de acordo com Li et al. (2015) que observaram variação na CIM de 25 µg/ml e 75 µg/ml para ácido elágico sobre *Candida* spp.

Observou-se que o valor de CIM para o ácido elágico complexado ou não em HP-β-CD foram iguais, mantendo a mesma concentração de rendimento na presença e ausência do encapsulado. Teodoro et al. (2017) ao testar ácido gálico, molécula que apresenta similaridades ao ácido elágico, complexado em ciclodextrina HP-β, obteve valores de CIM iguais na presença e ausência do complexado, observando o mesmo resultado do presente estudo. Da mesma forma, Tang et al. (2016), ao estudar posaconazol complexado em HP-β-CD, também obteve resultado similar, sugerindo que a complexação ao HP-β-CD não modifica a atividade antifúngica dos fármacos testes em suspensões planctônicas.

Conforme relatado em literatura, o ácido elágico (AE) possui dificuldade de solubilização, o que pode comprometer a sua biodisponibilidade (Bala et al., 2006a, 2006b; Lei et al., 2003). Desta forma, optou-se pela utilização da

ciclodextrina, buscando melhorar a solubilidade. A ciclodextrina utilizada no presente estudo, a hidroxipropil beta-ciclodextrina (HP- β -CD), foi selecionada para o trabalho por ser uma das mais utilizadas e ter capacidade de fornecer melhores resultados de complexação de acordo com a literatura (Loftsson et al., 2007).

O perfil do diagrama de fase estudado do complexo ácido elágico/HP- β -CD indicou a melhor formulação solúvel em NaOH 0,1M, apresentando uma curva de calibração de AE/ HP- β -CD com coeficiente de determinação ($R^2 = 0,9116$) caracterizada por um aumento linear de solubilidade do ácido elágico. Resultados semelhantes foram obtidos em estudos com a substância ácido gálico também complexado em HP- β -CD ($R^2 = 0,971$) (Teodoro et al., 2017). A molécula HP- β -CD possui em sua fórmula grupos hidroxipropil que podem resultar em grande aumento de solubilidade de até 60% de massa por volume (m/v), comparada a outras ciclodextrinas, como a β CD que costuma produzir complexos insolúveis ou poucos solúveis (Loftsson, Brewster, 1996; Loftsson et al, 2005; Teodoro et al., 2017).

Valores ideais da constante de estabilidade ($K_{1:1}$) variam entre 500 e 1000 M^{-1} (Szejtli, 1994). No presente estudo os valores de $K_{1:1}$ foram baixos (menores que 5,5 M^{-1}). Isso indica que, embora HP- β -CD tenha melhorado a solubilidade de AE (como mostra o resultado de diagrama de fase), esse aumento pode não ter sido o ideal. Quanto maior o valor $K_{1:1}$, menor é a concentração da droga livre, maior a formação do complexo de inclusão e conseqüentemente melhor será o efeito do aumento da solubilidade. Contudo, um valor elevado dessa constante pode afetar a liberação da molécula do meio interno das ciclodextrinas para o meio exterior, influenciando na atividade farmacológica apresentada pela molécula livre. Estudos anteriores também usando o ácido gálico demonstraram encapsulamento com ciclodextrina HP- β -CD por meio da técnica de spray drying em variados critérios metodológicos

(Olga et al., 2015; Teodoro et al., 2017) e eletrofiação (Aytac et al., 2016).

Análises por FTIR demonstraram diferenças na estrutura química entre as curvas de ácido elágico, a molécula de ciclodextrina, a mistura física e a complexação de ácido elágico em HP- β -CD demonstrando que houve complexação entre as moléculas. Estes achados corroboram relatos anteriores que indicam a técnica spray drying como método eficaz para complexação de drogas (Challa et al., 2005a). O estudo da solubilidade, a análise quantitativa do ácido elágico na complexação com a HP- β -CD em complexo seco por spray-dried por HPLC e o MEV, são um indicativo da formação do complexo ácido elágico em HP- β -CD (AE/ HP- β -CD).

Para explorar os possíveis mecanismo de interação entre o ácido elágico e *Candida*, os fungos foram submetidos a tratamento com concentração subinibitória de 12,5 μ g/ml para (ATCC 18804) e de 25 μ g/ml para (SC 5314).

Ocorreu redução estatisticamente significativa entre biofilmes de 48 horas tratados com ácido elágico complexado em HP- β -CD em relação ao controle não tratado. No entanto, este resultado não foi observado para biofilmes de 24 horas. Visto que a maturação do biofilme ocorre entre 24 e 48 horas, formando uma matriz multicamada mais complexa e aumentada com todas as células fúngicas presentes (Ramage et al., 2001), a maior atividade em biofilmes maduro foi inesperada. Este resultado é similar ao relatado por Teodoro et al. (2017), utilizando ácido gálico. Sabe-se que a dinâmica de um biofilme formado em 24 horas difere-se de um biofilme de 48 horas, como as suas características moleculares e o teor de água (Sheppard, Howell, 2016). Possivelmente, estas diferenças associadas aos diferentes componentes da matriz do biofilme podem estar associados à melhor performance dos compostos sobre biofilmes de 48 horas. A distribuição do fármaco é auxiliada pela presença dos canais de água na estrutura do biofilme e os componentes da matriz do biofilme podem retardar esse acesso. Existem evidências de diferenças entre taxas de difusão de drogas

quando se compara biofilmes formados por diferentes cepas de *C. albicans*, o que é mais uma evidência de que a efetividade de uma molécula pode ser influenciada por muitos fatores relacionados às especificidades de cada biofilme (Al-Fattani, Douglas, 2006).

A parede celular é um excelente alvo de drogas antifúngicas, por ser uma estrutura presente em fungos e ausente em células do hospedeiro (Roemer, Krysan, 2014). Investigou-se no presente trabalho se o ácido elágico, no tempo de 5 minutos, teria efeito sobre a parede celular de *Candida* através da análise de MEV. As imagens obtidas não sugerem ação na parede celular em concentração subinibitória. Sugere-se futuras análises com tempo de exposição maior ao ácido elágico ou concentrações maiores que a concentração subinibitórias para uma melhor avaliação.

O ensaio com proteção por sorbitol é utilizado para avaliar se a parede celular pode ser um alvo farmacológico da substância teste. Um meio contendo um estabilizador osmótico, o sorbitol, é capaz de reduzir o efeito do antifúngico, o que é evidenciado pelo aumento da CIM em meio contendo o sorbitol (Khan et al., 2013). Aumento na CIM sobre *C. albicans* ATCC 18804 após 2 dias foi observado, 50 µg/ml (+ sorbitol) de 25 µg/ml (- sorbitol). Este resultado deve ser avaliado com precaução, já que observou-se redução de apenas uma diluição. Esta redução na CIM foi bem inferior ao observado para o controle positivo (caspofungina). Não houve redução da CIM para a cepa SC 5314. Assim os resultados obtidos não foram suficientes para concluir que a parede celular é alvo primário do composto avaliado. Estes achados podem estar relacionados com a ausência de alteração morfológica evidenciado pelo MEV. Khan et al. (2013), também utilizaram esta metodologia para avaliação do efeito protetor do sorbitol na avaliação de dois fitocompostos. Estes autores observaram aumento nos valores de CIM sobre *Candida* e sugeriram que a parede fúngica poderia ser alvo da droga. Neste estudo este aumento da CIM também foi pequeno, de

apenas uma diluição. Observaram após 7 dias CIM de 80 µg/ml (+sorbitol) de 40 µg/ml (-sorbitol).

A fim de investigar se o ácido elágico tem ação sobre a membrana plasmática, foram planejados dois experimentos: a avaliação do extravasamento de conteúdo celular e avaliação sobre a biossíntese de ergosterol. Após estudo de metodologia empregada na literatura, para avaliar a integridade da membrana e experimentos pilotos, não foi possível obter dados a respeito do extravasamento de conteúdo celular após exposição ao AE. O método espectrofotométrico usualmente empregado poderia gerar resultados equivocados, pois a captação de dados do ensaio necessitava de leitura no comprimento de onda de 260 nm. A absorção de componentes celulares na faixa do 260 nm, representa um grupo de componentes, principalmente por nucleotídeos (Khan et al., 2013). Contudo, Bala et al. (2006), demonstram que o AE é lido em faixa de absorbância que engloba a 260 nm (de 255 e 276 nm). Desta forma, destacou-se a sobreposição das absorbâncias, o que inviabilizou a adoção da metodologia. Estudos futuros utilizando outros métodos tais como: análise por estimativa de extravasamento de potássio (Watanabe et al., 2006) e análise por citometria de fluxo para determinação de danos em membrana celular (Pinto et al., 2006) devem ser realizados.

A avaliação da ação sobre a biossíntese de ergosterol ao meio após exposição ao ácido elágico foi realizada. O ergosterol é um dos componentes da membrana plasmática de fungos (Mysyakina, Funtikova, 2007). Os resultados de quantificação do ergosterol de *C. albicans* demonstraram que não houve redução significativa em cepas ATCC 18804 após exposição de 5 minutos ao ácido elágico. Contrariamente, a exposição da cepa SC 5314 ao ácido levou a um aumento do ergosterol detectado. Este foi um resultado inesperado e deve ser objeto de estudos mais aprofundados. Outro aspecto que nos chama atenção é a pequena porcentagem do ergosterol em relação ao peso total, estes resultados

sugerem que outras metodologias com maior sensibilidade possam ser úteis para aprimorar esta investigação. Rajput e Mohan Karuppayil (2013) em metodologia similar a do presente estudo, quantificaram o conteúdo de ergosterol frente a amostras de *Candida* expostas a variados compostos e obtiveram percentual de redução de ergosterol variando de 40 a 99%. Contudo diferenças na metodologia empregada, unidade de captação dos dados e o fungo avaliado dificultam a comparação entre os estudos. Os níveis de ergosterol de, *Trichophyton rubrum*, expostos ao ácido elágico na concentração de 18,75 µg/ml por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC), obteve uma faixa de 1,73 a 4,30 µg/ml (Li et al., 2015), o que sugere que esta metodologia também possa ser empregada no futuro para estudos mais aprofundados.

A exposição a alguns antifúngicos podem causar redução na expressão de fatores de virulência (Andreola et al., 2016). Diversos fatores de virulência contribuem na patogenicidade de candidose bucal, dentre os principais encontram-se a produção de enzimas extracelulares, fosfolipases e proteinases, relacionadas a expressão de genes de resistência aos antifúngicos (Andreola et al., 2016). Fosfolipases são enzimas responsáveis por clivar os lipídeos, ação que auxilia na adesão a tecidos dos hospedeiros, enquanto proteases degradam proteínas da defesa imunológica, como: anticorpos, complemento e citocinas, ação que permite o fungo a fugir da primeira linha de defesa do hospedeiro (El-houssaini et al., 2019). Proteases induzem danos celular ao hospedeiro, promovem o crescimento de hifas por invasão tecidual, degradam também células de defesa do hospedeiro (Barbosa et al., 2019). A atividade das enzimas protease e fosfolipase não foram afetadas pela exposição ao ácido elágico. Trabalhos anteriores sobre a influência de ácido elágico a enzima fosfolipase não foram encontrados na literatura, para fins comparativos. Quanto a produção de proteinase, diferente do ocorrido neste estudo, Li et al. (2001) em metodologia distinta sobre *C. albicans*, demonstrou efeito de ácido elágico na

concentração de 10,5 μ M (3,2 μ g/ml) reduzindo a produção de proteinase. Atividade enzimática moderada a fortemente positiva para proteinase frente *C. albicans* foram observadas em estudos recentes (Barbosa et al., 2019).

Uma etapa inicial na patogênese da candidose bucal está relacionada à adesão de *Candida* às células epiteliais bucais, fenômeno que pode ser controlada na exposição a agentes antifúngicos (Barbosa et al., 2019). A adesão de *Candida* ao epitélio podem ocorrer por interação entre as adesinas fúngicas (receptores proteicos) e receptores epiteliais (Moyes et al., 2015). No presente trabalho, não houve diferença significativa na aderência de *C. albicans* após exposição ao ácido elágico no tempo de 1 minuto de exposição. Não foi detectado estudos com influência do ácido elágico na aderência de *C. albicans*. A exposição de 1 minuto de ácido elágico a *Candida* pode ter sido um tempo curto para causar alterações na interação entre adesinas e células epiteliais. Este tempo de exposição foi selecionado visando mimetizar uma aplicação clínica como enxaguatório bucal, porém, estudos futuros com tempos maiores de exposição devem ser realizados.

A filamentação de *Candida* é um importante fator de virulência que quando atenuado reduz o potencial infeccioso desse fungo (Lu et al., 2014; Saville et al., 2006). Houve aumento significativo na filamentação de *Candida* ATCC 18804 após exposição *in vitro* ao ácido elágico por 4 horas. O mesmo fenômeno não foi observado para *C. albicans* SC 5314, onde não houve diferença estatística significativa. Cepas de *C. albicans* SC 5314 são muito filamentosas (Kolecka et al., 2015), o que pode ter influenciado nos resultados observados.

O efeito tóxico sobre fibroblastos foi investigado. Tanto o ácido elágico puro quanto o complexado demonstraram citotoxicidade moderada na maior concentração testada de 250 μ g/ml, apresentando viabilidade celular de 58 a 63%, respectivamente (Sletten, Dahl, 1999). Os resultados corroboram o estudo

de Lourenção Brighenti et al. (2017), no qual ácido elágico não complexado também não apresentou citotoxicidade, tendo sido demonstrado 80% de viabilidade celular após a exposição a concentração de 50 µg/ml. No presente estudo em mesma concentração (50 µg/ml) foi encontrado valor similar de 79,4% de viabilidade celular na substância pura e 67,3% na substância contendo HP-β-CD.

Moscas *Drosophila melanogaster* mutantes com alteração na sinalização Toll são mais suscetíveis a fungos e são usadas com sucesso em estudos de patogênese fúngica (Chamilos et al., 2006). Os resultados demonstraram que o protocolo experimental adotado foi adequado para induzir infecção de *Candida*, neste modelo alternativo. Observou-se contagem média de UFC/moscas de $6,7 \times 10^4$, valor maior que em relatos anteriores com aproximadamente 8×10^2 e 2×10^3 UFC/moscas (Chamilos et al., 2006; Glittenberg et al., 2011). Esta diferença entre os resultados pode ser relacionada às diferenças metodológicas entre os estudos. Os estudos anteriores inocularam as células fúngicas em suspensão, enquanto que no presente estudo houve inoculação direta de uma alíquota da colônia fúngica. Foram realizadas tentativas de inoculação por suspensão de *Candida*, porém esta metodologia de infecção das moscas não foi reproduzível, havendo variabilidade na ocorrência ou não da infecção.

A inoculação com *C. albicans* ATCC 18804 em *Drosophila melanogaster* não foi capaz de causar infecção. Em contraste, a cepa SC 5314 que foi capaz de produzir infecção. Esta diferença pode estar relacionada às características fenotípicas das duas cepas. Sabe-se que a SC 5314 apresenta maior taxa de filamentação e maior virulência (Hirakawa et al., 2015). Chamilos et al. (2006), testaram isolados de cepas clínica de *C. albicans*, de pacientes com câncer e com candidose invasiva. Por outro lado, Glittenberg et al. (2011), inocularam as moscas com *C. albicans* SC 5314, mesma cepa utilizada neste estudo.

O AE obteve maior efeito protetor em *Drosophila melanogaster* na concentração de 3,2 µg/ml, apresentado até 50% de taxa de sobrevivência. Não foi observado efeito tóxico em concentrações baixas, porém indicou toxicidade moderada em concentrações mais elevadas. Salientamos que uma limitação do ensaio é o impedimento da avaliação da exata quantidade ingerida de droga pelas moscas. Um n amostral maior foi utilizado com o objetivo de reduzir a influência desta variável.

A metodologia de indução da candidose oral em murinos demonstrou-se efetiva, validada pelas lesões características na língua e corroborada com a observação de hifas e leveduras na análise histopatológica.

É importante destacar que a ocorrência de uma doença é o envolvimento da interação complexa entre o micro-organismo e o hospedeiro, envolvendo a expressão dos fatores de virulência de *Candida*, as interações do microbioma bacteriano e sistema imune do próprio hospedeiro (Höfs et al., 2016). Assim os estudos em modelo *in vivo* tornam-se importantes para a validação dos resultados obtidos *in vitro* e geração de dados para embasar a utilização clínica futura.

Apesar da redução de células viáveis em biofilme de 48 horas tratado com AE/HP-β-CD detectada *in vitro*, não foi observada redução significativa na contagem de UFC de *C. albicans* nas línguas dos animais com candidose bucal induzida experimentalmente. Fenômeno similar havia sido detectado em estudos anteriores do grupo (Borges et al., 2018). Assim, no presente trabalho foram realizados estudos piloto no sentido de diminuir as variáveis externas que pudessem influenciar nos resultados. Um dos pontos críticos na metodologia, é a recuperação das células fúngicas dos tecidos da língua. Hayama et al. (2012), sugeriu a tripsinização dos tecidos para permitir uma recuperação mais adequada das células fúngicas. No estudo piloto, tecidos foram ou não tripsinizados e o número de células fúngicas foi contado. Com base nestes experimentos piloto,

foi aplicado protocolo de tripsinização dos tecidos.

No presente projeto, o AE/HP- β -CD foi aplicada via tópica, duas vezes ao dia, durante 3 dias. O número de aplicações foi baseado na posologia da formulação farmacêutica da nistatina, considerado padrão ouro para o tratamento da candidose bucal. Cabe ressaltar que tratamento com nistatina para candidose bucal pode variar de 1 a 4 semanas e não há consenso sobre formulação, dosagem ou duração do tratamento (Lyu et al., 2016). Assim, estudos futuros, aumentando o número de dias de tratamento poderiam ser realizados para buscar uma melhor resposta ao AE/HP- β -CD.

A análise histopatológica das línguas dos animais submetidos à indução de candidose bucal experimental indica redução da invasão tecidual de hifas de *C. albicans* ao epitélio, nos grupos expostos aos tratamentos de ácido elágico complexado em HP- β -CD e nistatina, após tratamento por 24 e 48 horas, quando comparado aos controles sem tratamento. A nistatina é um fármaco de referência para o tratamento clínico da candidose oral (Lyu et al., 2016) e por isso foi incluída como controle positivo neste estudo.

Nos grupos analisados após 24 horas do último tratamento, o grupo tratado com ácido elágico complexado em ciclodextrina, atingiu níveis semelhantes de invasão tecidual ao grupo controle positivo tratado com nistatina. No entanto, na análise dos grupos após 48 horas do último tratamento, o grupo tratado com nistatina apresentou maior redução quando comparado com o grupo tratado com AE/HP- β -CD. No entanto, o grupo tratado com AE/HP- β -CD, apresentou menos alterações inflamatórias em 24 e 48 horas após o tratamento, quando comparado ao grupo não tratado. Esses achados corroboram estudos anteriores que relataram o efeito anti-inflamatório e antimicrobiano do AE (Bala et al., 2006a, 2006b; Nittayananta, 2016).

6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo indicaram ação antifúngica de valores semelhantes de CIM entre ácido elágico não complexado e complexado em HP- β -CD (AE/HP- β -CD), sugerindo que o complexado não altera atividade antifúngica de AE, apresentou também melhora de AE na solubilidade depois da complexação com HP- β -CD demonstrando ação em biofilme o qual utiliza altas concentrações para reduzir a viabilidade. O composto AE apresentou uma leve ação na quantificação de ergosterol. O complexo AE/HP- β -CD e AE não complexado confirmaram baixa toxicidade *in vitro* em CIM, porém, demonstram uma toxicidade moderada em concentrações elevadas como apresentado no teste de MTT, além de demonstrarem baixa toxicidade *in vivo*. O AE demonstrou efeito protetor em modelo *in vivo* de *Drosophila melanogaster*. E em corte histológico de modelo murinho, o ácido elágico complexado em H- β -CD apresentou diminuição do número de hifas invadindo o epitélio. Ação significativa do AE complexado em HP- β -CD em biofilme de 48 horas, difere do ocorrido *in vivo*.

REFERÊNCIAS*

Abolaji A, Kamdem JP, Farombi O, Batista J, Da Rocha T. *Drosophila melanogaster* as a Promising Model Organism in Toxicological Studies: A Mini Review Perfil fitoquímico e Atividades Biológicas de óleos essenciais View project in silico studies View project. *Arch basic Appl Med*. 2013;1(June):33–8.

Al-Fattani MA, Douglas LJ. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: Chemical composition and role in drug resistance. *J Med Microbiol*. 2006;55(8):999–1008. doi: 10.1099/jmm.0.46569-0. PMID: 16849719.

Alizadeh F, Khodavandi A, Zalakian S. Quantitation of ergosterol content and gene expression profile of ERG11 gene in fluconazole-resistant *Candida albicans*. *Curr Med Mycol*. 2017;3(1):13–9. doi: 10.29252/CMM.3.1.13. PMID: 29302625.

Andreola P, Demathea A, Galafassia D, Elsemanna EB, Elsemanna RB, Gazzoni AF. Estudo comparativo entre a produção de fosfolipases extracelulares e proteinases do gênero *Candida* isoladas a partir de infecções de cavidade oral. *Rev Odontol da UNESP*. 2016;45(4):219–26.

Aoki S, Ito-Kuwa S, Nakamura Y, Masuhara T. Comparative Pathogenicity of a Wild-Type Strain and Respiratory Mutants of *Candida albicans* in Mice. *Zentralblatt fur Bakteriologie*. 1990;273(3):332–43. doi: 10.1016/S0934-8840(11)80437-8. PMID: 1302.

Arthington-Skaggs BA, Jradi H, Desai T, Morrison CJ. Quantitation of ergosterol content: Novel method for determination of fluconazole susceptibility of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol*. 1999;37(10):3332–7. PMID: 10488201.

Aytac Z, Kuskü SI, Durgun E, Uyar T. Encapsulation of gallic acid/cyclodextrin inclusion complex in electrospun polylactic acid nanofibers: Release behavior and antioxidant activity of gallic acid. *Mater Sci Eng C*. 2016;63:231–9. doi: 10.1016/j.msec.2016.02.063. PMID: 27040215.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jan 2017]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Bala I, Bhardwaj V, Hariharan S, Kharade S V, Roy N, Ravi MN V. Sustained release nanoparticulate formulation containing antioxidant- ellagic acid as potential prophylaxis system for oral administration. *J Drug Target*. 2006;14(January):27–34. doi: 10.1080/10611860600565987.

Bala I, Bhardwaj V, Hariharan S, Kumar MNVR. Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies. *J Pharm Biomed Anal*. 2006;40(1):206–10. doi: 10.1016/j.jpba.2005.07.006. PMID: 16111850.

Balducci AG, Magosso E, Colombo G, Sonvico F, Khan NAK, Yuen KH, et al. Agglomerated Oral Dosage Forms of Artemisinin/ β -Cyclodextrin Spray-Dried Primary Microparticles Showing Increased Dissolution Rate and Bioavailability. *AAPS PharmSciTech*. 2013;14(3):911–8. doi: 10.1208/s12249-013-9982-9. PMID: 23703233.

Barbosa AH, Damasceno JL, Casemiro LA, Martins CHG, Pires RH, Candido RC. Susceptibility to Oral Antiseptics and Virulence Factors Ex Vivo Associated with *Candida* spp. Isolated from Dental Prostheses. *J Prosthodont*. 2019. doi: 10.1111/jopr.13037.

Bondaryk M, Kurzątkowski W, Staniszevska M. Antifungal agents commonly used in the superficial and mucosal candidiasis treatment: Mode of action and resistance development. *Postep Dermatologii i Alergol*. 2013;30(5):293–301. doi: 10.5114/pdia.2013.38358. PMID: 24353489.

Borges AC, de Moraes Gouvêa Lima G, Mayumi Castaldelli Nishime T, Vidal Lacerda Gontijo A, Kostov KG, Koga-Ito CY. Amplitude-modulated cold atmospheric pressure plasma jet for treatment of oral candidiasis: In vivo study. *PLoS One*. 2018;13(6):1–19. doi: 10.1371/journal.pone.0199832.

Brighenti FL, Salvador MJ, Delbem ACB, Delbem ÁCB, Oliveira MAC, Soares CP, et al. Systematic screening of plant extracts from the Brazilian pantanal with antimicrobial activity against bacteria with cariogenic relevance. *Caries Res*. 2014;48(5):353–60. doi: 10.1159/000357225. PMID: 24603299.

Calderone R, Sun N, Gay-Andrieu F, Groutas W, Weerawarna P, Prasad S, et al. Antifungal drug discovery: The process and outcomes. *Future Microbiol*. 2014;9(6):791–805. doi: 10.2217/fmb.14.32. PMID: 25046525.

Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. 2001;9(7):327–35. doi: 10.1016/S0966-842X(01)02094-7. PMID:

11435107.

Challa R, Ahuja A, Ali J, Khar RK. Cyclodextrins in drug delivery: An updated review. *AAPS PharmSciTech*. 2005a;6(2):E329-57. doi: 10.1208/pt060243. PMID: 16353992.

Challa R, Alka A, Javed A, Khar R. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. *AAPS PharmSciTech*. 2005b;6(2):E329-57. doi: 10.1208/pt060243. PMID: 16353992.

Chamilos G, Lionakis MS, Lewis RE, Lopez-Ribot JL, Saville SP, Albert ND, et al. *Drosophila melanogaster* as a Facile Model for Large-Scale Studies of Virulence Mechanisms and Antifungal Drug Efficacy in *Candida* Species. *J Infect Dis*. 2006;193(7):1014–22. doi: 10.1086/500950. PMID: 16518764.

Chandra J, Mukherjee PK. Candida biofilms: development, architecture and resistance. *Microbiol Spectr*. 2015;3(4):1–24. doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0020-2015.Candida.

Chevalier M, Medioni E, Prêcheur I. Inhibition of *Candida albicans* yeast-hyphal transition and biofilm formation by *Solidago virgaurea* water extracts. *J Med Microbiol*. 2012;61(Part 7):1016–22. doi: 10.1099/jmm.0.041699-0. PMID: 22422572.

Clinical and laboratory standards institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast. Pennsylvania: Clinical and laboratory standards institute; 2008.

Connors KA. The Stability of Cyclodextrin Complexes in Solution. *Chem Rev*. 1997;97(5):1325–58. doi: 10.1021/cr960371r. PMID: 11851454.

Davis MM, Alvarez FJ, Ryman K, Holm ÅA, Ljungdahl PO, Engström Y. Wild-type *Drosophila melanogaster* as a model host to analyze nitrogen source dependent virulence of *Candida albicans*. *PLoS One*. 2011;6(11):e27434. doi: 10.1371/journal.pone.0027434. PMID: 22110651.

de Matos BM, Ribeiro ZEA, Balducci I, Figueiredo MS, Back-Brito GN, Mota AJ Da, et al. Oral microbial colonization in children with sickle cell anaemia under long-term prophylaxis with penicillin. *Arch Oral Biol*. 2014;59(10):1042–7. doi: 10.1016/j.archoralbio.2014.05.014. PMID: 24967510.

El-houssaini HH, Elnabawy OM, Nasser HA. Influence of subinhibitory antifungal concentrations on extracellular hydrolases and biofilm production by *Candida albicans* recovered from Egyptian patients. *BMC Infect Dis.* 2019;1–9. doi: doi.org/10.1186/s12879-019-3685-0.

Ellepola ANB, Chandy R, Khan ZU. Post-antifungal effect and adhesion to buccal epithelial cells of oral *Candida dubliniensis* isolates subsequent to limited exposure to amphotericin B, ketoconazole and fluconazole. *J Investig Clin Dent.* 2015;6(3):186–92. doi: 10.1111/jicd.12095. PMID: 24850753.

Etgeton SA, Chassot F, Boer CG, Donatti L, Svidzinski TIE, Consolaro MEL. Influência da co-agregação entre *Candida albicans* e *Lactobacillus acidophilus* na capacidade de adesão destes microrganismos às células epiteliais vaginais humanas (CEVH). *Acta Sci - Heal Sci.* 2011;33(1):1–8. doi: 10.4025/actascihealthsci.v33i1.7218.

Fidel PL. *Candida*-host interactions in HIV disease: implications for oropharyngeal candidiasis. *Adv Dent Res.* 2011;23(1):45–9. doi: 10.1177/0022034511399284. PMID: 21441480.

Frost DJ, Brandt KD, Cugier D, Goldman R. A Whole-Cell *Candida albicans* Assay for the Detection of Inhibitors towards Fungal Cell Wall Synthesis and Assembly. *J Antibiot (Tokyo).* 1995;48(4):306–10. doi: 10.7164/antibiotics.48.306. PMID: 7775267.

Gabriela N, Rosa AM, Catiana ZI, Soledad C, Mabel OR, Esteban SJ, et al. The effect of *Zuccagnia punctata*, an Argentine medicinal plant, on virulence factors from *Candida* species. *Nat Prod Commun.* 2014;9(7):933–6. PMID: 25230496.

Glittenberg MT, Silas S, MacCallum DM, Gow NAR, Ligoxygakis P. Wild-type *Drosophila melanogaster* as an alternative model system for investigating the pathogenicity of *Candida albicans*. *Dis Model Mech.* 2011;4(4):504–14. doi: 10.1242/dmm.006619. PMID: 21540241.

Goulart LS, Souza WWR de, Vieira CA, Lima JS de, Olinda RA de, Araújo C de. Oral colonization by *Candida* species in HIV-positive patients: association and antifungal susceptibility study. *Einstein (São Paulo).* 2018;16(3):eAO4224. doi: 10.1590/s1679-45082018ao4224. PMID: 30088546.

Hayama K, Maruyama N, Abe S. Cell preparation method with trypsin digestion for counting of colony forming units in *Candida albicans*-infected mucosal

tissues. *Med Mycol.* 2012;87(8):858–62. doi: 10.3109/13693786.2012.683538. PMID: 22646242.

Hirakawa MP, Martinez DA, Sakthikumar S, Anderson MZ, Berlin A, Gujja S, et al. Genetic and phenotypic intra-species variation in *Candida albicans*. *Genome Res.* 2015;25(3):413–25. doi: 10.1101/gr.174623.114. PMID: 25504520.

Höfs S, Mogavero S, Hube B. Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. *J Microbiol.* 2016. doi: 10.1007/s12275-016-5514-0. PMID: 26920876.

Hoyer LL, Green CB, Oh S-H, Zhao X. Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) gene family – a sticky pursuit. *Med Mycol.* 2008;46(1):1–15. doi: 10.1080/13693780701435317. PMID: 17852717.

Hube B. From commensal to pathogen: Stage- and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol.* 2004;7(4):336–41. doi: 10.1016/j.mib.2004.06.003. PMID: 15288621.

Jain A, Jain S, Rawat S. Emerging fungal infections among children: A review on its clinical manifestations, diagnosis, and prevention. *J Pharm Bioallied Sci.* 2010;2(4):314. doi: 10.4103/0975-7406.72131.

Jayatilake JAMS, Samaranayake LP. Experimental superficial candidiasis on tissue models. *Mycoses.* 2010;53(4):285–95. doi: 10.1111/j.1439-0507.2010.01879.x.

Khan MSA, Ahmad I, Cameotra SS. Phenyl aldehyde and propanoids exert multiple sites of action towards cell membrane and cell wall targeting ergosterol in *Candida Albicans*. *AMB Express.* 2013;3(1):1–16. doi: 10.1186/2191-0855-3-1. PMID: 24010721.

Kolecka A, Chorvát Jr D, Bujdáková H. The impact of growth conditions on biofilm formation and the cell surface hydrophobicity in fluconazole susceptible and tolerant *Candida albicans*. *Folia Microbiol (Praha).* 2015;60(1):45–51. doi: 10.1007/s12223-014-0338-y. PMID: 25100641.

Lei F, Xing DM, Xiang L, Zhao YN, Wang W, Zhang LJ, et al. Pharmacokinetic study of ellagic acid in rat after oral administration of pomegranate leaf extract. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2003;796(1):189–94. doi:

10.1016/S1570-0232(03)00610-X. PMID: 14552830.

Li XC, Jacob MR, Pasco DS, ElSohly HN, Nimrod AC, Walker LA, et al. Phenolic compounds from *Miconia myriantha* inhibiting *Candida* aspartic proteases. *J Nat Prod*. 2001;64:1282–5. doi: 10.1021/np010172p. PMID: 11678651.

Li Z, Guo X, Dawuti G, Aibai S. Antifungal Activity of Ellagic Acid In Vitro and In Vivo. *Phyther Res*. 2015;29(7):1019–25. doi: 10.1002/ptr.5340.

Loftsson T, Brewster ME. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *J Pharm Sci*. 1996;85(10):1017–25. doi: 10.1021/js950534b. PMID: 8897265.

Loftsson T, Hreinsdóttir D, Stefánsson E. Cyclodextrin microparticles for drug delivery to the posterior segment of the eye : aqueous dexamethasone eye drops. *J Pharm Pharmacol*. 2007;59(5):629–35. doi: 10.1211/jpp.59.5.0002.

Loftsson T, Jarho P, Masson M, Jarvinen T. Cyclodextrins in drug delivery system. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005;59(5):629–35. doi: 10.1016/S0169-409X(98)00051-9. PMID: 16296758.

Loftsson T, Konrádsdóttir F, Másson M. Influence of aqueous diffusion layer on passive drug diffusion from aqueous cyclodextrin solutions through biological membranes. *Pharmazie*. 2006;61(2):83–9. PMID: 16526552.

Lourenção Brighenti F, Salvador MJ, Gontijo AVL, Delbem ACB, Delbem ÁCB, Soares CP, et al. Plant extracts: Initial screening, identification of bioactive compounds and effect against *Candida albicans* biofilms. *Future Microbiol*. 2017;12(1):15–27. doi: 10.2217/fmb-2016-0094.

Lu Y, Su C, Liu H. *Candida albicans* hyphal initiation and elongation. *Trends Microbiol*. 2014;22(12):707–14. doi: 10.1016/j.tim.2014.09.001. PMID: 25262420.

Lyu X, Zhao C, Yan ZM, Hua H. Efficacy of nystatin for the treatment of oral candidiasis: A systematic review and meta-analysis. *Drug Des Devel Ther*. 2016;10:1161–71. doi: 10.2147/DDDT.S100795. PMID: 27042008.

Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 2013;4(2):119–28. doi: 10.4161/viru.22913. PMID: 23302789.

Miles BYAA, Misra SS. the Estimation of the Bactericidal Power of the Blood. *J Hyg (Lond)*. 1931;38(6):732–49. doi: 10.1017/S002217240001158X. PMID: 20475467.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1–2):55–63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4. PMID: 6606682.

Moyes DL, Richardson JP, Naglik JR. *Candida albicans*-epithelial interactions and pathogenicity mechanisms: Scratching the surface. *Virulence*. 2015;6(4):338–46. doi: 10.1080/21505594.2015.1012981. PMID: 25714110.

Mysyakina IS, Funtikova NS. The role of sterols in morphogenetic processes and dimorphism in fungi. *Microbiology*. 2007;6(1):5–18. doi: 10.1134/S0026261707010018. PMID: 17410869.

Nett JE. Future directions for anti-biofilm therapeutics targeting *Candida*. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2014;12(3):375–82. doi: 10.1586/14787210.2014.885838. PMID: 24506174.

Nittayananta W. Oral fungi in HIV: challenges in antifungal therapies. *Oral Dis*. 2016;22:107–13. doi: 10.1111/odi.12394. PMID: 27109279.

Okada M, Hisajima T, Ishibashi H, Miyasaka T, Abe S, Satoh T. Pathological analysis of the *Candida albicans*-infected tongue tissues of a murine oral candidiasis model in the early infection stage. *Arch Oral Biol*. 2013;58(4):444–50. doi: 10.1016/j.archoralbio.2012.09.014. PMID: 23092606.

Olga G, Styliani C, Ioannis RG. Coencapsulation of Ferulic and Gallic acid in hp-b-cyclodextrin. *Food Chem*. 2015;185:33–40. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.03.058. PMID: 25952838.

Pereira DFA, Pinheiro MM, Silva PNF, Teodoro GR, Brighenti FL, Koga-Ito CY. Influence of TNF- α blockers on the oral prevalence of opportunistic microorganisms in ankylosing spondylitis patients. *Clin Exp Rheumatol*. 2012;30(5):679–85. doi: 5276 [pii]. PMID: 22935381.

Pfaller MA, Castanheira M, Messer SA, Moet GJ, Jones RN. Variation in *Candida* spp. distribution and antifungal resistance rates among bloodstream infection isolates by patient age: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009). *Diagn Microbiol Infect Dis*.

2010;68(3):278–83. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2010.06.015. PMID: 20846808.

Pinto E, Pina-Vaz C, Salgueiro L, Gonçalves MJ, Costa-De-Oliveira S, Cavaleiro C, et al. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *J Med Microbiol*. 2006;55(10):1367–73. doi: 10.1099/jmm.0.46443-0. PMID: 17005785.

Polak A. Virulence of *Candida albicans* mutants. *Mycoses*. 1992;35(1–2):9–16. doi: 10.1111/j.1439-0507.1992.tb00813.x. PMID: 113.

Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*. 1982;20(1):7–14. PMID: 7038928.

Promsong A, Chung WO, Satthakarn S, Nittayananta W. Ellagic acid modulates the expression of oral innate immune mediators: Potential role in mucosal protection. *J Oral Pathol Med*. 2015;44(3):214–21. doi: 10.1111/jop.12223. PMID: 25047680.

Rajput SB, Mohan Karuppayil S. Small molecules inhibit growth, viability and ergosterol biosynthesis in *Candida albicans*. *Springerplus*. 2013;2(1):1–6. doi: 10.1186/2193-1801-2-26. PMID: 23449869.

Ramage G, Martínez JP, López-Ribot JL. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: A clinically significant problem. *FEMS Yeast Res*. 2006;6(7):979–86. doi: 10.1111/j.1567-1364.2006.00117.x. PMID: 17042747.

Ramage G, Vandewalle K, Wickes BL, López-Ribot JL. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol*. 2001;18(4):163–70. doi: 200118163 [pii]. PMID: 15496122.

Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Benink HA, Worzlla TJ, Minor L. Cell Viability Assays. *Assay Guid Man*. 2004:1–23. doi: 10.1007/978-1-61779-108-6_6. PMID: 23805433.

Roemer T, Krysan DJ. Antifungal drug development: challenges, unmet clinical needs, and new approaches. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014;4(5):pii: a019703. doi: 10.1101/cshperspect.a019703. PMID: 24789878.

Rosa Teixeira KI, Araújo PV, Almeida Neves BR, Bohorquez Mahecha GA,

Sinisterra RD, Cortés ME. Ultrastructural changes in bacterial membranes induced by nano-assemblies β -cyclodextrin chlorhexidine: SEM, AFM, and TEM evaluation. *Pharm Dev Technol*. 2013;18(3):600–8. doi: 10.3109/10837450.2011.649853. PMID: 22260726.

Rossoni RD, Barbosa JO, Vilela SFG, Dos Santos JD, De Barros PP, De Cristina M, et al. Competitive interactions between *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. krusei* during biofilm formation and development of experimental candidiasis. *PLoS One*. 2015;10(7):1–23. doi: 10.1371/journal.pone.0131700. PMID: 26146832.

Rudrangi SRS, Bhomia R, Trivedi V, Vine GJ, Mitchell JC, Alexander BD, et al. Influence of the preparation method on the physicochemical properties of indomethacin and methyl- β -cyclodextrin complexes. *Int J Pharm*. 2015;479(2):381–90. doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.01.010. PMID: 25579867.

Salvia ACRD, Figueiredo MS, Braga JAP, Pereira DFA, Brighenti FL, Koga-Ito CY. Hydroxyurea therapy in sickle cell anemia patients aids to maintain oral fungal colonization balance. *J Oral Pathol Med*. 2013;42(7):570–5. doi: 10.1111/jop.12029. PMID: 23278631.

Sampaio A da G, Gontijo AVL, Araujo HM, Koga-Ito CY. In vivo efficacy of ellagic acid against *Candida albicans* in a *Drosophila melanogaster* infection model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(12):pii: e01716-18. doi: 10.1128/AAC.01716-18.

Saville SP, Lazzell AL, Bryant AP, Fretzen A, Monreal A, Solberg EO, et al. Inhibition of filamentation can be used to treat disseminated candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(10):3312–6. doi: 10.1128/AAC.00628-06. PMID: 17005810.

Senpuku H, Sogame A, Inoshita E, Tsuha Y, Miyazaki H, Hanada N. Systemic diseases in association with microbial species in oral biofilm from elderly requiring care. *Gerontology*. 2003;49(5):301–9. doi: 10.1159/000071711. PMID: 12920350.

Sheppard DC, Howell PL. Biofilm exopolysaccharides of pathogenic fungi: Lessons from bacteria. *J Biol Chem*. 2016. doi: 10.1074/jbc.R116.720995. PMID: 27129222.

Sletten GBG, Dahl JE. Cytotoxic effects of extracts of compomers. *Acta*

Odontol Scand. 1999. doi: 10.1080/000163599428544. PMID: 10777134.

Staab JF, Bahn YS, Tai CH, Cook PF, Sundstrom P. Expression of transglutaminase substrate activity on *Candida albicans* germ tubes through a coiled, disulfide-bonded N-terminal domain of Hwp1 requires C-terminal glycosylphosphatidylinositol modification. *J Biol Chem*. 2004;279(39):40737–47. doi: 10.1074/jbc.M406005200. PMID: 15262971.

Szejtli J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chem Rev*. 1998;98(5):1743–54. doi: 10.1021/CR970022C. PMID: 11848947.

Szejtli J. Medicinal applications of cyclodextrins. *Med Res Rev*. 1994;14(3):353–86. doi: 10.1002/med.2610140304. PMID: 8007740.

Taff HT, Mitchell KF, Edward JA, Andes DR. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. *Future Microbiol*. 2013;8(10):1325–37. doi: 10.2217/fmb.13.101. PMID: 24059922.

Tang P, Ma X, Wu D, Li S, Xu K, Tang B, et al. Posaconazole/hydroxypropyl- β -cyclodextrin host-guest system: Improving dissolution while maintaining antifungal activity. *Carbohydr Polym*. 2016;142:16–23. doi: 10.1016/j.carbpol.2016.01.042. PMID: 26917368.

Teixeira KIR. Estudo das alterações da membrana celular de microrganismos por compostos de inclusão de clorexidina: beta-ciclodextrina em diferentes proporções molares usando Microscopia de Força Atômica e Microscopia Eletrônica de Varredura [dissertação]. Belo Horizonte (MG):. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia; 2008. doi: 10.1016/j.bcp.2009.01.018. PMID: 19447218.

Teodoro GR, Brighenti FL, Delbem ACB, Delbem ÁCB, Khouri S, Gontijo AVL, et al. Antifungal activity of extracts and isolated compounds from *Buchenavia tomentosa* on *Candida albicans* and non-*albicans*. *Future Microbiol*. 2015a;10(6):917–27. doi: 10.2217/fmb.15.20.

Teodoro GR, Ellepola K, Seneviratne CJ, Koga-Ito CY. Potential use of phenolic acids as anti-*Candida* agents: a review. *Front Microbiol*. 2015b;6(Dec):1–11. doi: 10.3389/fmicb.2015.01420. PMID: 26733965.

Teodoro GR, Gontijo AVL, Borges AC, Tanaka MH, Lima GDMG, Salvador MJ, et al. Gallic acid/hydroxypropyl- β -cyclodextrin complex: Improving

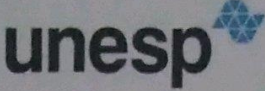
solubility for application on in vitro/in vivo *Candida albicans* biofilms. PLoS One. 2017;12(7):1–15. doi: 10.1371/journal.pone.0181199. PMID: 28700692.

Watanabe H, Azuma M, Igarashi K, Ooshima H. Relationship between cell morphology and intracellular potassium concentration in *Candida albicans*. J Antibiot (Tokyo). 2006;59(5):281–7. doi: 10.1038/ja.2006.39.

Wellmer A, Bernhardt H. Adherence on buccal epithelial cells and germ tube formation in the continuous flow culture of clinical *Candida albicans* isolates. Mycoses. 1997;40(9–10):363–8. doi: 10.1111/j.1439-0507.1997.tb00251.x.

Williams DW, Kuriyama T, Silva S, Malic S, Lewis MAO. *Candida* biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. Periodontol 2000. 2011;55(1):250–65. doi: 10.1111/j.1600-0757.2009.00338.x. PMID: 21134239.

ANEXO A – Certificado CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais



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

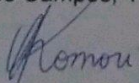


CERTIFICADO
CEUA – Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo registrado sob o nº 05/2017, intitulado:- "Avaliação do potencial de aplicação do ácido elágico nanoencapsulado em ciclodextrina no tratamento da candidose bucal." sob a responsabilidade de **CRISTIANE YUMI KOGA ITO**, tendo como orientada a aluna de Pós-Graduação-Mestrado **ALINE DA GRAÇA SAMPAIO** e que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS** (CEUA – ICT – CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS-UNESP), em reunião de 11/08/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	11/08/2017 a 01/07/2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongo/heterogênico Mus musculus Swiss
Nº de Animais	60
Peso/Idade	Camundongo:- 30 grs – 60 dias
Sexo	MACHO
Origem	Biotério Central – Campus de Botucatu-UNESP

São José dos Campos, 11 de agosto de 2017



Profa.Dra. PAULA CAROLINA KOMORI DE CARVALHO
Coordenadora

Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Dumas
CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9028 / 9076
Fax (12) 3947-9010 / gacdes@fosjc.unesp.br/komori@fosjc.unesp.br