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

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

MATHEUS APARECIDO DOS SANTOS RAMOS

Profa. Dra. Taís Maria Bauab
Orientadora

Profa. Dra. Margarete Teresa Gottardo de Almeida
Coorientadora

Araraquara
2019

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

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

MATHEUS APARECIDO DOS SANTOS RAMOS

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

Profa. Dra. Taís Maria Bauab
Orientadora

Profa. Dra. Margarete Teresa Gottardo de Almeida
Coorientadora

Araraquara
2019

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

R175s

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

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

Orientadora: Taís Maria Bauab.
Coorientadora: Margarete Teresa Gottardo de Almeida.

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

CAPES: 40300005

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTOR: MATHEUS APARECIDO DOS SANTOS RAMOS
ORIENTADORA: TAIS MARIA BAUAB
COORIENTADORA: MARGARETE TERESA GOTTARDO DE ALMEIDA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de conhecimento: Sem Área de Conhecimento pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. TAIS MARIA BAUAB
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. CARLOS HENRIQUE GOMES MARTINS
Universidade de Franca / Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada

Profa. Dra. FLAVIA APARECIDA RESENDE NOGUEIRA
Universidade de Araraquara- UNIARA

Profa. Dra. ELFRIEDE MARIANNE BACCHI
Departamento de Farmácia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP- São Paulo

Profa. Dra. MARA CORREA LELLES NOGUEIRA
Departamento de Doenças Dermatológicas, Infecciosas e Parasitárias / Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP)

Araraquara, 25 de janeiro de 2019

Epígrafe

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

Encontrarei você lá!

(Em memória de José Joaquim dos Santos)

Dedicatória

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

Para a minha querida mãe (Fátima Ramos).

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

Esta luta vencida também é sua.

Para o meu querido Pai (Edivaldo Ramos).

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

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

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

Agradecimento especial

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

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

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

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

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

Essa vitória é nossa!!!

Agradecimentos

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

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

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

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

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

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

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

emboscadas da vida!

Ao meu avô **Guilhermino Ramos** (*in memorian*) que mesmo após 21 anos de ausência física permanece vivo em meu coração e em minha vida! Quando fecho os olhos ainda lembro-me de nós dois. Sinto sua proteção e amor aí de cima!!!

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

obrigado!

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Aos meus doces amigos **Ana Paula Barreto** e **Giovani Jacomini**. Agradeço pelo carinho e amor incondicional. Em especial agradeço também pelo "pacotinho" que vocês me deram, meu sobrinho **Joaquim**

Barreto Jacomini, um raiozinho de sol que me enche de amor e alegria. Eu amo vocês meus amigos.

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

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

A todos os amigos que encontrei durante o período do doutorado sanduíche na **University Medical Center Groningen – UMCG**. Deixo aqui um agradecimento especial aos meus preciosos colegas de office do BME-UMCG, os quais partilhamos momentos de muita alegria e felicidade durante o ano todo: **Damla Keskin, Yan Yan Wu, Ruifang Gao, Colin Rosman, Zhiwei Cui, Yori Ong, Derly Tescaro e Liu Yong**. Vocês fizeram este ano ainda mais especial.

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

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

Deixo um agradecimento especial aos técnicos laboratoriais **Willy De**

Visser, Jelly Atema-Smith, Reinier de Bron, Betsy Van der Belt, Jop de Vries e Minnie H. Vocês foram essenciais para que muitos dos experimentos realizados fossem concluídos com sucesso. Minha eterna gratidão!

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

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

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

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

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

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

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

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fases móveis empregadas nos ensaios de CCD para o extrato e frações de *S. nitens* **....86**

Tabela 2. Sequência de primers utilizados nos experimentos de RT-PCR**.....114**

Tabela 3. Grupos experimentais e tratamentos do ensaio *in vivo*.**.....119**

Tabela 4. Rendimentos das frações do extrato metanólico de *S. nitens* obtidas por EFS. **.....122**

Tabela 5. Resultados da atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *S. nitens* e suas frações sobre cepas de *C. albicans* e *L. acidophilus* **.....124**

Tabela 6. Resultados do potencial inibitório da luteolina pura sobre cepas de *C. albicans* e *L. acidophilus* **.....134**

Tabela 7. Características e composição das formulações escolhidas **.....136**

Tabela 8. Valores das médias e desvio-padrão dos diâmetros das gotículas e IPD para a as formulações desenvolvidas após o preparo (tempo 0) e três meses depois (tempo 3). **.....138**

Tabela 9. Média e desvio-padrão do potencial Zeta das formulações com e sem a presença do derivado vegetal nos tempos 0 e 3 meses após o preparo das formulações **.....139**

Tabela 10. Comportamento de fluxo (n) e índice de consistência (K) das formulações livres (F1 e F9) e com o derivado vegetal (F1 I e F9 I)**.....141**

Tabela 11. Resultados do potencial antimicrobiano do extrato metanólico de *S. nitens* livre e incorporado nas formulações (F1 EXT e F9 EXT) e da fração Fr3 livre e incorporada (F1 Fr3 F9 Fr3) sobre as cepas de *C. albicans* **.....144**

Tabela 12. Resultados do potencial antimicrobiano do extrato metanólico de *S. nitens* livre e incorporado nas formulações (F1 EXT e F9 EXT) e da fração Fr3 livre e incorporada (F1 Fr3 F9 Fr3) sobre as cepas de *L. acidophilus* e *G. vaginalis* **.....145**

Tabela 13. Atividade antifúngica *in vitro* do extrato bruto não incorporado (EXT) e incorporado nas formulações F1 e F9 (F1 EXT e F9EXT) e da fração Fr3 não incorporada (Fr3) e incorporada (F1Fr3 e F9Fr3) frente às cepas não-*albicans*.....**145**

Tabela 14. Avaliação *in vitro* do potencial inibitório do extrato bruto não incorporado (EXT) e incorporado nas formulações F1 e F9 (F1 EXT e F9EXT) e da fração Fr3 não incorporada (Fr3) e incorporada (F1Fr3 e F9Fr3) e do fármaco padrão anfotericina B (AnB) em presença e ausência de exógenos de ergosterol frente às cepas padrão (ATCC 10231) clínica (CAV) de *C. albicans*.....**146**

Tabela 15. Potencial inibitório *in vitro* do extrato bruto não incorporado (EXT) e incorporado nas formulações F1 e F9 (F1 EXT e F9EXT) e da fração Fr3 não incorporada (Fr3) e incorporada

(F1Fr3 e F9Fr3) em presença e ausência de sorbitol frente à cepa clínica de *C. albicans* CAV. **147**

Tabela 16. Resultados da análise de ângulo de contato da agua sobre laminas de vidro com a presença e ausência dos derivados vegetais incorporados e não incorporados nos sistemas de liberação de fármacos **155**

Tabela 17. Composição elementar do vidro limpo e amostras contendo monocamadas dos derivados vegetais não incorporados (EXT e Fr3) e incorporados (F1 EXT, F9 EXT, F1 Fr3, F9 Fr3) nas formulações F1 e F9 sobre a superfície..... **156**

Tabela 18. Espessura e imagens por TCO dos biofilmes monotípicos e heterotípicos formados sobre a superfície de poços de placas de 24 orifícios após 48 horas de formação. **159**

Tabela 19. Resultados da determinação do potencial citotóxico *in vitro* (IC_{50}) do extrato metanólico de *S. nitens* e fração 3 não incorporados (EXT e Fr3) e incorporados na formulação F1 (F1 EXT e F1 Fr3) e F9 (F9 EXT e F9 Fr3) sobre diferentes linhagens..... **170**

Tabela 20. Análise do peso corpóreo dos animais que compuseram o experimento in vivo no decorrer do ensaio..... **173**

Tabela 21. Resultados da quantificação da carga microbiana vaginal dos animais pertencentes aos diferentes grupos do experimento *in vivo* de CVV..... **175**

Tabela 22. Resultados da quantificação da carga microbiana vaginal dos animais pertencentes aos diferentes grupos do experimento *in vivo* de CVV após 7 dias do final do período de tratamento (análise de recidiva de infecção). **176**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diferenças morfológicas e estruturais da espécie *C. albicans* em relações de comensalismo, infecções superficiais e sistêmicas. **41**

Figura 2. Processo cíclico de formação de biofilmes microbianos em superfícies. **54**

Figura 3. Processo cíclico de formação de biofilmes de *C. albicans*. **58**

Figura 4. Esquematização simplificada da divisão da família botânica Eriocaulaceae **67**

Figura 5. *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland – Planta vegetal **69**

Figura 6. Artesanato obtido através do "capim dourado"como matéria-prima **70**

Figura 7. Principais estratégias de ação de nanopartículas desenvolvidas para atuarem sobre biofilmes microbianos **76**

Figura 8. Esquematização das nanomicelas que compõe as NE óleo/água e água/óleo **79**

Figura 9. Representação esquemática do fracionamento por EFS em fase reversa (C18) para a obtenção das frações do extrato metanólico de *S. nitens.* **84**

Figura 10. Ensaios de microdiluição revelados com solução de TTC 2% para as cepas leveduriformes (A) e com resazurina 0,01% para as cepas bacterianas (B). **88**

Figura 11. Reação de redução do XTT **89**

Figura 12. Reação de oxirredução da resazurina **90**

Figura 13. Equipamento utilizado e processo de obtenção das formulações **92**

Figura 14. Representação de um ensaio de inibição de biofilmes em placas de 96 poços revelado com XTT **99**

Figura 15. Reação de redução do XTT **100**

Figura 16. Câmara de fluxo contendo as amostras vegetais para adsorção **102**

Figura 17. Sistema de fluxo hidrostático com monitoramento em tempo real **104**

Figura 18. Ensaio de determinação da atividade metabólica de biofilmes utilizando o MTT **111**

Figura 19. Esquematização da reação de redução do sal de MTT em formazan pela acao de desidrogenases mitocondriais **111**

Figura 20. Fotomicrografia de células epiteliais vaginais de ratas induzido ao estado pseudo-estro com a utilização de cipionato de estradiol observadas por microscopia óptica em aumento de 40X **118**

Figura 21. Esquema do ensaio terapêutico experimental *in vivo* de candidíase vulvovaginal **120**

Figura 22. Cromatoplacas apresentando as análises cromatográficas do extrato de *S. nitens* e suas frações por CCD **123**

Figura 23. Cromatograma (CLAE-DAD) do extrato metanólico de *S. nitens* no comprimento de onda de 350 nm. Condições cromatográficas: coluna Thermo Hypersil Gold aQ® C18 (250 x 4,6 mm; 5 μm); fase móvel em modo gradiente - 5-100% de metanol por 50 min, seguido de metanol por 10 min; vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção de 20 μL **125**

Figura 24. Cromatograma (CLAE-DAD) das frações 2 e 2.1 no comprimento de onda de 350 nm. Condições cromatográficas: coluna Thermo Hypersil Gold aQ® C18 (250 x 4,6 mm; 5 μm); fase móvel em modo gradiente - 5-100% de metanol por 50 min, seguido de metanol por 10 min; vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção de 20 μL **126**

Figura 25. Cromatograma (CLAE-DAD) das frações 3 e 3.1 no comprimento de onda de 350 nm. Condições cromatográficas: coluna Thermo Hypersil Gold aQ® C18 (250 x 4,6 mm; 5 μm); fase móvel em modo gradiente - 5-100% de metanol por 50 min, seguido de metanol por 10 min; vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção de 20 μL **126**

Figura 26. Cromatograma (CLAE-DAD) das frações 4 e 4.1 no comprimento de onda de 350 nm. Condições cromatográficas: coluna Thermo Hypersil Gold aQ® C18 (250 x 4,6 mm; 5 μm); fase móvel em modo gradiente - 5-100% de metanol por 50 min, seguido de metanol por 10 min; vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção de 20 μL **127**

Figura 27. Cromatograma (CLAE-DAD) das frações 5 e 5.1 no comprimento de onda de 350 nm. Condições cromatográficas: coluna Thermo Hypersil Gold aQ® C18 (250 x 4,6 mm; 5 μm); fase móvel em modo gradiente - 5-100% de metanol por 50 min, seguido de metanol por 10 min; vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção de 20 μL **127**

Figura 28. Cromatograma (CLAE-DAD) do extrato metanólico dos escapos de *S. nitens* no comprimento de onda de 280 nm. Condições cromatográficas: coluna Luna C18(2) Phenomenex® (250 x 4,6 mm; 5 μm); fase móvel em gradiente 5% B por 3 min, 5-38% B por 11 min, 38% B por 3 min, 38-42% B por 8 min (modo gradiente) 42% B por 10 min; a partir de 47% B por 5 min; volume de injeção de 20 μL **129**

Figura 29. Cromatograma (CLAE-DAD) de Fr3 no comprimento de onda de 280 nm. Condições cromatográficas: coluna Luna C18(2) Phenomenex® (250 x 4,6 mm; 5 μm); fase móvel em gradiente 5% B por 3 min, 5-38% B por 11 min, 38% B por 3 min, 38-42% B por 8 min (modo gradiente) 42% B por 10 min; a partir de 47% B por 5 min; volume de injeção de 20 μL **130**

Figura 30. Cromatograma do padrão luteolina no comprimento de onda de 280 nm. Condições cromatográficas: coluna Luna C18(2) Phenomenex® (250 x 4,6 mm; 5 μm); fase móvel em gradiente 5% B por 3 min, 5-38% B por 11 min, 38% B por 3 min, 38-42% B por 8 min (modo gradiente) 42% B por 10 min; a partir de 47% B por 5 min; volume de injeção de 20 μL. **131**

Figura 31. Cromatograma CLAE-DAD (A = Fr 3; B = Luteolina; C= Fr 3 + luteolina) no comprimento de onda de 280 nm. Condições cromatográficas: coluna Luna C18(2) Phenomenex® (250 x 4,6 mm; 5 μm); fase móvel em gradiente 5% B por 3 min, 5-38% B por 11 min, 38% B por 3 min, 38-42% B por 8 min (modo gradiente) 42% B por 10 min; a partir de 47% B por 5 min; volume de injeção de 20 μL **132**

Figura 32. Cromatograma do extrato metanólico de escapos de *S. nitens* realizado por Pacífico et al. (2011) **133**

Figura 33. Sobreposição dos cromatogramas da fração Fr3 (rosa) e do extrato metanólico dos escapos de *S. nitens* (azul)..... **134**

Figura 34. Digrama de fases ternário segundo características visuais observadas em cada formulação obtida a partir de diferentes proporções dos constituintes do SLN..... **135**

Figura 35. Fotomicrografias das formulações analisadas por MLP sob aumento de 20X **137**

Figura 36. Resultados da avaliação da força mucoadesiva *in vitro* das formulações desenvolvidas **140**

Figura 37. Comportamento reológico contínuo das formulações F1, F1 I, F9 e F9 I **141**

Figura 38. Comportamento reológico em fluxo oscilatório das formulações F1, F1 I, F9 e F9I **142**

Figura 39. Imagens obtidas por TEM das formulações F1 e F9 sem a presença do dos derivados vegetais e após a incorporação do extrato (F1 EXT e F9 EXT) e da Fr3 (F1 Fr3 e F9 Fr3) sob aumento de 100.00 X. **143**

Figura 40. Resultados do potencial anti-biofilme *in vitro* da fração Fr3 livre e incorporada na formulação F1 (F1 Fr3) e F9 (F9 Fr3) sobre biofilmes maduros de *C. albicans* ATCC 10231..... **148**

Figura 41. Resultados do potencial anti-biofilme *in vitro* da fração Fr3 livre e incorporada na formulação F1 (F1 Fr3) e F9 (F9 Fr3) sobre biofilmes maduros de *C. albicans* CAV 3 **149**

Figura 42. Resultados do potencial anti-biofilme *in vitro* da fração Fr3 livre e incorporada na formulação F1 (F1 Fr3) e F9 (F9 Fr3) sobre biofilmes maduros de *C. albicans* CAS 1 **149**

Figura 43. Cinética de adesão de *C. albicans* ATCC 10231 em câmara de fluxo hidrostático contendo as amostras do extrato metanólico de *S. nitens* 1,0 mg / mL (EXT livre) e incorporado nas formulações 1 (F1 EXT) e 9 (F9 EXT) na mesma concentração, em comparação com o controle de adesão positivo (vidro limpo).....**150**

Figura 44. Cinética de adesão de *C. albicans* ATCC 10231 em câmara de fluxo hidrostático contendo as amostras da Fração Fr3 - 1,0 mg / mL (Fr3 livre) e incorporada nas formulações 1 (F1 Fr3) e 9 (F9 Fr3) na mesma concentração, em comparação com o controle de adesão positivo (vidro limpo).....**151**

Figura 45. Porcentagem de células de *C. albicans* ATCC 10231 aderentes em monocamadas contendo amostras de extrato metanólico de *S. nitens* (A) e amostras de fração Fr3 (B) em comparação com o controle positivo de aderência usando vidro limpo (100%).....**153**

Figura 46. Fotomicrografia obtida por microscopia óptica (10X) apresentando uma comparação entre o grupo de controle positivo de adesão (vidro limpo) composto por vidro limpo e os experimentos contendo as amostras do extrato metanólico (EXT livre, F1 EXT, F9 EXT) e a fração (Fr3 livre, F1 Fr3, F9 Fr3), após a passagem de uma interface líquido-ar sobre células aderidas após a cinética de fluxo de 2h em condições de balanço hidrostático.....**154**

Figura 47. Espectro de absorção geral por XPS apresentando as energias de ligação (eV) das amostras contendo os compostos vegetais não incorporados e incorporados nos sistemas de liberação de fármacos em comparação com o controle (vidro limpo) **157**

Figura 48. Quantificação da biomassa total dos biofilmes monotípicos e heterotípicos através da leitura em absorbância (570 nm) da coloração dos biofilmes após o método de cristal violeta.....**158**

Figura 49. Atividade metabólica de biofilmes heterotípicos formados por *C. albicans* ATCC 10231 + *G. vaginalis* BME-1 após o tratamento com os derivados vegetais não incorporados e incorporados nos sistemas de liberação de fármacos pelo método de redução do MTT (A) e a determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC) após o tratamento (B-E) nas concentrações avaliadas. **161**

Figura 50. Atividade metabólica de biofilmes heterotípicos formados por *C. albicans* ATCC 10231 + *L. acidophilus* ATCC 4356 após o tratamento com os derivados vegetais não incorporados e incorporados nos sistemas de liberação de fármacos pelo método de redução do MTT(A) e a determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC) após o tratamento(B-E) nas concentrações avaliadas. **162**

Figura 51. Atividade metabólica de biofilmes monotípicos de *L. acidophilus* ATCC 4356 após o tratamento com os derivados vegetais não incorporados e incorporados nos sistemas de liberação de fármacos pelo método de redução do MTT. **164**

Figura 52. Atividade metabólica de biofilmes monotípicos de *G. vaginalis* BME-1 após o tratamento com os derivados vegetais não incorporados e incorporados nos sistemas de liberação de fármacos pelo método de redução do MTT. **164**

Figura 53. Atividade metabólica de biofilmes monotípicos de *C. albicans* ATCC 10231 após o tratamento com os derivados vegetais não incorporados e incorporados nos sistemas de liberação de fármacos pelo método de redução do MTT (A) e a determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC) após o tratamento(B-E) nas concentrações avaliadas. **166**

Figura 54. Quantificação da expressão genica de ALS 3 normalizada empregando o gene de IFB1 como gene de referencia sobre biofilmes maduros tratados com os derivados vegetais não incorporados e incorporados nos sistemas de liberação de fármacos e também sobre os biofilmes não tratados (controle). **167**

Figura 55. Quantificação da expressão genica de CDR 1 normalizada empregando o gene de IFB1 como gene de referencia sobre biofilmes maduros tratados com os derivados vegetais não incorporados e incorporados nos sistemas de liberação de fármacos e também sobre os biofilmes não tratados (controle). **168**

Figura 56. Quantificação da expressão genica de CDR 2 normalizada empregando o gene de IFB1 como gene de referencia sobre biofilmes maduros tratados com os derivados vegetais não incorporados e incorporados nos sistemas de liberação de fármacos e também sobre os biofilmes não tratados (controle). **168**

Figura 57. Quantificação da expressão genica de ERG 11 normalizada empregando o gene de IFB1 como gene de referencia sobre biofilmes maduros tratados com os derivados vegetais não incorporados e incorporados nos sistemas de liberação de fármacos e também sobre os biofilmes não tratados (controle). **169**

Figura 58. Resultados da analise da toxicidade *in vivo* em modelo experimental de *Artemia salina* empregando o extrato não incorporado (EXT) incorporado em F1 (F1 EXT) e em F9 (F9 EXT) **171**

Figura 59. Resultados da analise da toxicidade *in vivo* em modelo experimental de *Artemia salina* empregando a fração 3 não incorporada (Fr3) incorporado em F1 (F1 Fr3) e em F9 (F9 Fr3) **172**

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A/O- Água em óleo

AMB- anfotericina B

AMP- ampicilina

ASD- Ágar Sabouraud Dextrose

ASD+clo- Ágar Sabouraud Dextrose acrescido de cloranfenicol

ATCC- *Americam Type Culture Collection*

CAS1- Cepa Clínica de *Candida albicans* sensível ao fluconazol

CAV3- Cepa Clínica de *Candida albicans* resistente ao fluconazol

CBM- Concentracao Bactericida Mínima

CCD- Cromatografia em Camada Delgada

cDNA- complementary Deoxyribonucleic Acid

CE- Campo escuro

CEUA- Comitê de Ética do Uso de Animais

CFM- Concentração Fungicida Mínima

CIM- Concentração Inibitória Mínima

CL_{50}- Concentracao Letal Mediana

CLAE- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLAE-DAD- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodos

CLSI- *Clinical Laboratory Standart Institute*

CO_2- Gás Carbônico

CSD- Caldo Sabouraud Dextrose

CVV- Candidíase Vulvovaginal

CVVR- Candidíase Vulvovaginal Recorrente

DMSO- Dimetilsulfóxido

DNA- *Deoxyribonucleic Acid*

DO- Densidade Óptica

DP- Dispersão Polimérica

EFS- Extração em Fase Sólida

EPS- Matriz extracelular polimérica

EUA- Estados Unidos da América

F1 EXT- Extrato metanólico de *S. nitens* incorporado na formulação F1

F1 Fr3- Fração 3 do extrato metanólico de *S. nitens* incorporada na formulação F1

F1- Formulação 1

F9 EXT- Extrato metanólico de *S. nitens* incorporado na formulação F9

F9 Fr3- Fração 3 do extrato metanólico de *S. nitens* incorporada na formulação F9

F9- Formulação 9

FA- Fase Aquosa

FDA- Food and Drug Administration

FO- Fase Oleosa

Fr1- Fração 1 do extrato metanólico de *S. nitens*

Fr1.1- Fração 1.1 do extrato metanólico de *S. nitens*

Fr2- Fração 2 do extrato metanólico de *S. nitens*

Fr2.1- Fração 2.1 do extrato metanólico de *S. nitens*

Fr3- Fração 3 do extrato metanólico de *S. nitens*

Fr3.1- Fração 3.1 do extrato metanólico de *S. nitens*

Fr4- Fração 4 do extrato metanólico de *S. nitens*

Fr4.1- Fração 4.1 do extrato metanólico de *S. nitens*

Fr5- Fração 5 do extrato metanólico de *S. nitens*

Fr5.1- Fração 5.1 do extrato metanólico de *S. nitens*

Fr6- Fração 6 do extrato metanólico de *S. nitens*

Fr6.1- Fração 6.1 do extrato metanólico de *S. nitens*

HPLC- *High Performance Liquid Chromatography*

HPV- *Human Papiloma Virus*

IC_{50}- Índice de Citotoxicidade Mediana

MDR- M*ultidrug resistance*

ME- Microemulsão

MeOH- Metanol

MLP- Microscopia de Luz Polarizada

MOPS- Ácido 3-[N-morfino] propanossulfônico

mRNA- *Messenger Ribonucleic Acid*

MTT- Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio

MVA- Muco Vaginal Artificial

NE- Nanoemulsao

O/A- Óleo em água

OMS- Organização Mundial da Saúde

PZ- Potencial Zeta

PZ- Potencial Zeta

QS- *Quorum sensing*

RPMI 1640- *Roswell Park Memorial Institute medium*

SF- Separação de Fases

SFB- Soro Fetal Bovino

SIDA- Síndrome de Imunodeficiência Adquirida

SLN- Sistema Lipídico Nanoestruturado

SLT- Sistema Líquido Transparente

SUS- Sistema Único de Saúde

SVO- Sistema Viscoso Opaco

SVST- Sistema Viscoso Semi-transparente

SVT- Sistema Viscoso Transparente

T- Tensoativo

T_R- Tempo de Retenção

TEM- Microscopia Eletrônica de Transmissão

TTC- Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio

UFC- Unidade Formadora de Colônia

UFC/mL- Unidade Formadora de Colônia por mililitro

UV- Luz Ultravioleta

VB- Vaginose Bacteriana

V_m- Volume Morto

XTT- 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -5- [carbonilo (fenilamino)]-2H-tetrazólio-hidróxido

YNB- *Yeast Nitrogen Base*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO **32**
2. REVISÃO DA LITERATURA **38**
2.1. *Candida albicans*: características gerais e impactos na saúde humana **38**
2.1.1. A candidíase vulvovaginal (cvv) **43**
2.1.1.2. A terapêutica da CVVe CVVR **46**
2.2. Biofilmes microbianos **51**
2.2.1. Biofilmes de *C. albicans:* arquitetura e características especiais **56**
2.2.2. A complexidade envolvida no tratamento e erradicação de biofilmes **59**
2.3. A biodiversidade como fonte de moléculas bioativas na prospecção de antimicrobianos. **63**
2.3.1. A família botânica eriocaulaceae **66**
2.3.1.1. A espécie *Syngonanthus nitens* (bong.) Ruhland **68**
2.4. Nanotecnologia farmacêutica **71**
2.4.1. Sistemas lipídicos nanoestruturados **77**
2.4.1.1. As nanoemulsões **78**
3. OBJETIVOS **81**
3.1. Objetivo geral **81**
3.2. Objetivos específicos **81**
4. MATERIAL E MÉTODOS **83**
4.1. Obtenção e procedência do material vegetal de *S. nitens* **83**
4.1.1. Preparo do extrato metanólico **83**
4.2. Fracionamento do extrato metanólico de escapos de *S. nitens* **84**
4.2.1. Análise por cromatografia em camada delgada **86**
4.2.2. Análise inicial do extrato metanólico de *S. nitens* e suas frações por cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a um detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD). **86**
4.2.3. Análise biomonitorada do extrato metanólico de escapos e das frações de *S. nitens* **87**
4.2.3.1. Escolha da fração mais ativa **90**
4.2.4. Análise química da fração ativa eleita como a mais promissora da investigação e do extrato metanólico **90**
4.3. Desenvolvimento do sistema lipídico nanoestruturado (SLN) **91**
4.3.1. Desenvolvimento das formulações e elaboração do diagrama de fases ternário **91**

4.3.2. Ensaios farmacotécnicos e caracterização das formulações escolhidas **92**
4.3.2.1. Microscopia de luz polarizada (MLP) **92**
4.3.2.2. dispersão de luz dinâmica e ensaio de estabilidade **92**
4.3.2.3. Análise do potencial zeta (PZ) **93**
4.3.2.4. Avaliação *in vitro* da força mucoadesiva **94**
4**.3.2.5.** Ensaios reológicos **95**
4.3.2.5.1. Análise reológica contínua **95**
4.3.2.5.2. Análise reológica oscilatória **95**
4.3.2.6. Microscopia eletrônica de transmissão **94**
4.4. Ensaios biológicos **96**
4.4.1. Análise do potencial antimicrobiano dos derivados vegetais incorporados nos sistemas nanoestruturados selecionados **96**
4.4.2. Determinação do mecanismo de ação dos derivados de *S. nitens* não incorporados e incorporados sobre *C. albicans* **95**
4.4.2.1. Interação sorbitol **95**
4.4.2.2. Interação ergosterol **96**
4.4.3. Análise do potencial anti-biofilme de Fr3 ..... **98**
4.4.3.1. Ensaio de inibição de biofilmes monotípicos **98**
4.4.3.1.1. Formação dos biofilmes **98**
4.4.3.1.2. Tratamento e avaliação da atividade sobre biofilmes maduros **99**
4.4.4. Aprimoramento dos estudos da ação dos derivados de *S. nitens* sobre biofilmes associados com a CVV **100**
4.4.4.1. Determinação da interferência dos derivados de *S. nitens* na adesão de *C. albicans* em superfície **101**
4.4.4.1.1. Micro-organismo e condições de crescimento **101**
4.4.4.1.2. Cinética de adesão de *C. albicans* em superfície sob condições de fluxo (ensaio de adesão em câmara de fluxo – flow chamber) **102**
4.4.4.1.2.1. Câmara de fluxo e adição dos derivados vegetais **102**
4.4.4.1.2.2. Ensaio cinético de adesão sobre condição hidrodinâmica de fluxo **103**
4.4.4.1.2.3. Análise de adesão final **104**
4.4.4.2. Análises das monocamadas contendo os derivados vegetais sobre a superfície **105**
4.4.4.2.1. Determinação do ângulo de contato de água sobre as monocamadas **105**
4.4.4.2.2. Espectroscopia de fotoelétrons de raios-x (XPS) **106**
4.4.4.3. Avaliação do potencial antimicrobiano sobre biofilmes associados com a CVV **106**

4.4.4.3.1. Micro-organismos e condições de crescimento **106**
4.4.4.3.2. Preparação das suspensões microbianas **107**
4.4.4.3.3. Formação *in vitro* dos biofilmes maduros **107**
4.4.4.3.3.1. Biofilmes monotípicos **107**
4.4.4.3.3.2. Biofilmes heterotípicos **108**
4.4.4.3.3.3. Determinação da formação dos biofilmes **108**
4.4.4.3.3.3.1. Obtenção da biomassa total **108**
4.4.4.3.3.3.2. Determinação da espessura dos biofilmes por tomografia por coerência óptica.... (TCO) **109**
4.4.4.3.3.4. Tratamento e avaliação da atividade anti-biofilme **109**
4.4.4.3.3.5. Quantificação individual da atividade sobre os biofilmes heterotípicos **111**
4.4.4.3.4. Análise da influencia dos tratamentos sobre a expressão genica de biofilmes maduros **112**
4.4.4.3.4.1. Extração e armazenamento dos biofilmes **112**
4.4.4.3.4.2. Extração e quantificação e purificação do mRNA total **112**
4.4.4.3.4.3. Genes estudados e primers **113**
4.4.4.3.4.4. Análise quantitativa da expressão genica de *ALS3, CDR1, CDR2* e *ERG11* em biofilmes tratados e não tratados **114**
4.4.4.3.4.4.1. Preparação das amostras **114**
4.4.4.3.4.4.2. Reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR) **114**
4.4.5. Ensaios de toxicidade **115**
4.4.5.1. Avaliação *in vitro* do potencial citotóxico **115**
4.4.5.2. Avaliação da toxicidade *in vivo* sob modelo de *Artemia salina* **115**
4.4.5.2.1. Obtenção dos cistos de *Artemia salina* **116**
4.4.5.2.1.1. Ensaio de toxicidade em *Artemia salina* **116**
4.4.6. Avaliação do potencial terapêutico da cvv em modelo experimental *in vivo* de roedores **116**
4.4.6.1. Delineamento experimental **117**
4.4.6.1.1. Estabelecimento da infecção **117**
4.4.6.1.2. Grupos experimentais e tratamento terapêutico **119**
4.4.6.1.3. Análise da eficácia do tratamento **120**
4.4.6.1.4. Análise da recidiva de infecção e eutanásia **121**
5. RESULTADOS **122**

5.1. Fracionamento do extrato metanólico do extrato de *S. nitens* **122**
5.1.1. Análise das frações de *S. nitens* por cromatografia em camada delgada **122**
5.1.2. Análise biomonitorada das frações e do extrato metanólico de escapos de *S. nitens* ... **124**
5.1.3. Análise por CLAE-DAD do extrato metanólico e suas frações **125**
5.1.4. Análise química da fração ativa eleita como a mais promissora da investigação (Fr3) e do extrato metanólico **128**
5.1.5. Análise antimicrobiana da luteolina pura **134**
5.2. Desenvolvimento do sistema lipídico nanoestruturado (SLN) **135**
5.2.1. Diagrama de fases ternário **135**
5.2.1.1. Escolha das formulações para análises farmacotécnicas e biológicas **136**
5.3. Ensaios farmacotécnicos e caracterização das formulações escolhidas **136**
5.3.1. Microscopia de luz polarizada (MLP) **137**
5.3.2. Dispersão de luz dinâmica e ensaio de estabilidade **137**
5.3.3. Análise do potencial zeta (PZ) **139**
5.3.4. Avaliacao *in vitro* da forca mucoadesiva **139**
5.3.5. Ensaios reológicos **140**
5.3.5.1. Ensaio reológico de fluxo contínuo **140**
5.3.5.1. Ensaio reológico de fluxo oscilatório **142**
5.3.6. Microscopia eletrônica de transmissão **140**
5.4. Determinação do potencial antimicrobiano do extrato de *S. nitens* e da fração fr3 sobre células planctônicas **1422**
5.5. Determinação do mecanismo de ação dos derivados de *S. nitens* não incporados e incorporados sobre *C.albicans* **144**
5.5. Ensaio com ergosterol **144**
5.5. Ensaio com sorbitol **145**
5.6. Análise da fração fr3 no potencial anti-biofilme de *C. albicans* **148**
5.7. Aprimoramento dos estudos da ação dos derivados de *S. nitens* sobre biofilmes associados com a CVV **150**
5.7.1. Cinética de adesão de *C. albicans* em superfície sob condições de fluxo (ensaio de adesão em câmara de fluxo – flow chamber) **150**
5.7.1.1. Análise de adesão final **152**
5.7.1.2. Análises das monocamadas contendo os derivados vegetais sobre a superfície **155**
5.7.1.2.1. Ângulo de contato da água **155**

5.7.1.2.2. Análise da composição elementar das monocamadas por XPS **155**
5.7.2. Avaliação do potencial anti-biofilme **158**
5.7.2.1. Determinação da formação dos biofilmes **158**
5.7.2.1.1. Obtenção da biomassa total pelo método de coloração do cristal violeta **158**
5.7.2.1.2. Análise da espessura dos biofilmes **159**
5.7.2.2. Determinação da ação antimicrobiana sobre biofilmes maduros associados com a CVV **160**
5.7.2.2.1. Atividade sobre biofilmes heterotípicos **160**
5.7.2.2.2. Atividade sobre biofilmes monotípicos **163**
5.7.3. Análise da influencia dos tratamentos sobre a expressão genica de biofilmes maduros **167**
5.8. Ensaios de toxicidade **170**
5.8.1. Determinação do potencial citotóxico *in vitro* **170**
5.8.2. Avaliação da toxicidade *in vivo* em modelo de *Artemia salina* **171**
5.9. Avaliação do potencial terapêutico da cvv em modelo experimental *in vivo* de roedores. **173**
6. DISCUSSÃO **178**
7. CONCLUSÕES **212**
8. REFERÊNCIAS **214**
9.ANEXOS **234**

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

ROBBINS; WRIGHT, 2017).

As infecções por fungos patogênicos surgiram nas últimas décadas como uma crescente ameaça global para a saúde humana. De maneira geral, os fungos desencadeiam processos infecciosos de natureza oportunista, principalmente em pacientes que possuem algum déficit no sistema imunológico, tais como os infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou como consequência de avanços médicos modernos como o uso de quimioterápicos de maneira terapêutica ou profilática, transplante de órgãos, implantação de dispositivos médicos sintéticos, ou mesmo aqueles que possuem doenças de base como o lúpus, diabetes entre outras (BROWN et al., 2012).

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

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

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

de neoplasias na região cervical (GEMMILL et al., 2010).

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

De maneira geral, e não somente em eventos relacionados com a CVV, os episódios infecciosos agudos, que em sua maioria são desencadeados por células microbianas em forma planctônica têm sido combatidos com o uso de vacinas e antibióticos, no entanto, assim como todo ser vivo, os micro-organismos desenvolvem estratégias para garantir sua sobrevivência e adaptação ao stress ambiental, sendo assim, cooperam-se entre si desenvolvendo uma coesa e robusta comunidade de células com forte comunicação intercelular, assim denominado de biofilme (FUX et al., 2005; SARDI et al., 2014; NETT; ANDES, 2015).

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

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

vez que existe um número limitado de agentes eficazes contra biofilmes (RAMOS et al., 2018).

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

Em vista do cenário atual, pesquisadores de todo o mundo desenvolvem novas estratégias de combate e controle de doenças microbianas e permanecem firmes na busca por novas fontes de moléculas bioativas com aplicabilidade antimicrobiana e que exerçam a ação farmacológica de maneira eficaz, e com baixos índices de efeitos secundários. Baseando-se nestas ideias, a ciência moderna encontra na biodiversidade o suporte necessário para que pesquisas clínico-farmacológicas sejam desenvolvidas todos os anos e novas abordagens terapêuticas sejam introduzidas à sociedade, servindo de suporte e fonte de disseminação de informações relacionadas principalmente ao potencial farmacológico de produtos naturais, tais como as plantas medicinais (CRAGG; PEZZUTO, 2016) .

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

A Etnofarmacologia classifica-se como a grande aliada na busca de novos compostos naturais com a atividade biológica, facilitando o acesso à ampla diversidade de famílias botânicas que possuem naturalmente constituintes químicos importantes que podem ser utilizados na elucidação de novos compostos com atividade antimicrobiana, a exemplo, destaca-se o conhecimento sobre as propriedades de plantas pertencentes a família Eriocaulaceae, a qual é composta por mais de 1200 espécies de monocotiledôneas incomuns predominantemente encontradas nos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço – no estado de

Minas Gerais e também da Serra do Jalapão no Estado do Tocantins. Esta família destaca-se não só pela grande riqueza especificamente observada, mas também pelo elevado número de táxons endêmicos desta formação geológica além dos estudos relacionados com o perfil antimicrobiano e fitoquímico (ANDRADE et al., 2010; PACIFICO et al., 2011; GIULIETTI et al., 2012; RAMOS et al., 2016).

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

No ano seguinte, em um estudo quantitativo de flavonoides, naftopiranonas e xantonas de espécies da família Eriocaulaceae, foi verificado a presença do flavonóide luteolina como sendo um dos componentes majoritário do extrato metanólico de escapos de *S. nitens*, o que corroborou para que estudos biológicos utilizando o extrato vegetal fossem desenvolvidos a fim de fornecer aplicações terapêuticas para espécie em questão (ANDREA et al., 2012). A presença deste flavonóide é de grande interesse em investigações de produtos naturais com atividade antimicrobiana, uma vez que o mesmo possui atividade antimicrobiana comprovada na literatura científica contra diversas espécies de bactérias patogênicas (SHEN et al., 2014).

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

Os estudos biológicos realizados com o extrato metanólico de *S. nitens* são promissores e estimulam a busca por alternativas que possam aumentar a potencialidade deste

composto vegetal no que se diz respeito ao aprimoramento dos parâmetros farmacológicos, neste sentido, a busca por ferramentas tais como a nanotecnologia farmacêutica mostra-se de grande impacto e importância.

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

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

Em vista da aplicabilidade deste importante sistema de liberação de fármacos, estima-se que o seu emprego como agente veiculador de derivados de *S. nitens* possa ser uma alternativa interessante no que se diz respeito ao tratamento da CVV, uma vez que estes sistemas já foram descritos na literatura como veículos potencilaizadores de princípios biotivos por via intravaginal (SILVA et al., 2014). Sendo assim, a proposta deste trabalho mostra-se válida e de importante aplicabilidade para a pesquisa de uma nova alternativa para o tratamento desta doença.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Nesta seção propõe-se apresentar os principais tópicos que contribuirão para um melhor entendimento e contextualização da temática central desta Tese. As referências utilizadas basearam-se em contribuições feitas por importantes pesquisadores da área, as quais foram obtidas em bases de dados como o PubMed, Scielo e Web of Science, além de livros, Dissertações e Teses, sendo estes publicados nas versões impresso e digital.

2.1. *Candida albicans*: características gerais e impactos na saúde humana

Nos últimos anos, as diversas áreas das Ciências da Saúde tem dado grande importância às infecções desencadeadas por espécies pertencentes ao gênero *Candida*, uma vez que dados epidemiológicos demonstram cada vez mais o aumento significativo dos níveis de mortalidade ocasionados micro-organismos deste gênero, principalmente em pacientes imunocomprometidos, àqueles submetidos ao uso prolongado de antibióticos de amplo espectro (relação direta com a resistência aos fármacos), uso de cateteres intravasculares e uretrais de longa permanência, hemodiálise, tratamento com corticosteróides, nutrição parenteral, uso de antineoplásicos imunossupressores, transplantes, entre outros (ANTAS et al., 2012; MAYER; WILSON; HUBE, 2013; NOBLE; GIANETTI; WITCHLEY, 2016).

Classificada como um fungo dimórfico pertencente a um gênero composto por mais de 200 espécies, e com diversos estudos desenvolvidos a fim de estabelecer parâmetros explicativos para entender mais sobre os benefícios e riscos aos seres humanos, a espécie *C. abicans* ainda é parte do cenário clinico das doenças infecciosas desde seu primeiro relato a mais de 150 anos atrás (CAGGIANO et al., 2015; NOBLE; GIANETTI; WITCHLEY, 2016).

De maneira geral, o estado natural da espécie *C. albicans* é colonizar a mucosa digestiva e genital. O primeiro e principal contato para a aquisição deste micro-organismo se dá quando a mãe é colonizada (via vaginal predominantemente) e a transmissão ocorre durante o nascimento, o que dispara a participação inicial no sistema imunológico, entretanto, a aquisição desta levedura também é associada à contaminação fecal (SOBEL, 2007). Uma das principais características de *C. albicans* em contraste com as bactérias do trato digestivo, é a sua capacidade de colonizar todos os segmentos que originam-se desde a cavidade oral até

o ânus, e isso denota que 20-80% dos indivíduos são colonizados em um dado momento, com variações ao longo do tempo para o mesmo indivíduo (SOBEL, 2015). Apesar dos benefícios da colonização por *C. albicans* ainda não serem claros, os prejudiciais são bem conhecidos e estudados.

Devido apresentar considerável plasticidade morfogênica, esta espécie pode ser encontrada principalmente na forma de levedura, hifas, pseudo-hifas e clamidósporos, onde cada um destes tipos morfológicos tem seu papel atribuído durante seu desenvolvimento e evolução e, consequentemente, no desenvolvimento e progressão das infecções nos seres humanos (CALDERONE; FONZI, 2001; MUKAREMERA et al., 2017). Além destas características, *C. albicans* possui capacidade de adaptação a diversos tipos de condições ambientais, exemplo disso é possibilidade de crescimento em anaerobiose, condição esta que muitas vezes é considerada adversa para alguns micro-organismos (DUMITRU et al., 2004).

As leveduras são morfologicamente classificadas como células de formato arredondado e/ou ovalado oriundas através do processo de reprodução conhecido como brotamento, onde a divisão nuclear ocorre na junção entre célula mãe e célula filha. À medida que as células da progenitura se separam completamente das células da mãe após a citocinese, as leveduras são consideradas unicelulares (SUDBERY; GOW; BERMAN, 2004). As hifas são classificadas como sendo células finas em forma de tubo segmentado, nos quais a divisão nuclear ocorre dentro das células filhas, seguido pela migração de um núcleo de volta para as células mãe. Após completa divisão celular, as novas estruturas permanecem fortemente fixadas, de tal forma que as células leveduriformes subsequentes de divisões celulares deem inicio a um processo de arranjo de estruturas filamentares, multicelulares e ramificadas, assim chamadas micélio (MUKAREMERA et al., 2017).

As pseudo-hifas possuem formato elipsoide e são dotadas de características tanto de leveduras como de hifas, entretanto, ainda existem controvérsias se estas estruturas celulares representam um tipo de célula referente a algum processo terminal de divisão e maturação ou se podem ser encontradas no processo intermediário entre levedura e hifa. De maneira semelhante às hifas, as pseudo-hifas permanecem anexadas após a citocinese e geram micélios após processos de divisão celular, e tal como nas leveduras, a divisão nuclear ocorre nas uniões mãe-filha; em contraste com as hifas, essas junções são demarcadas por entalhes visíveis (NOBLE; GIANETTI; WITCHLEY, 2016).

Finalmente, os clamidósporos são classificados como células grandes, esféricas e de

paredes grossas. Assim como o esporo bacteriano, esta estrutura celular está diretamente relacionada com o perfil de resistência e manutenção da espécie, uma vez que podem ser encontrados em células expostas à hipóxia e falta de nutrientes. Os clamidósporos são produzidos por células que se encontram nas extremidades distal dos filamentos miceliais, hifas e pseudo-hifas(WHITEWAY; BACHEWICH, 2007).

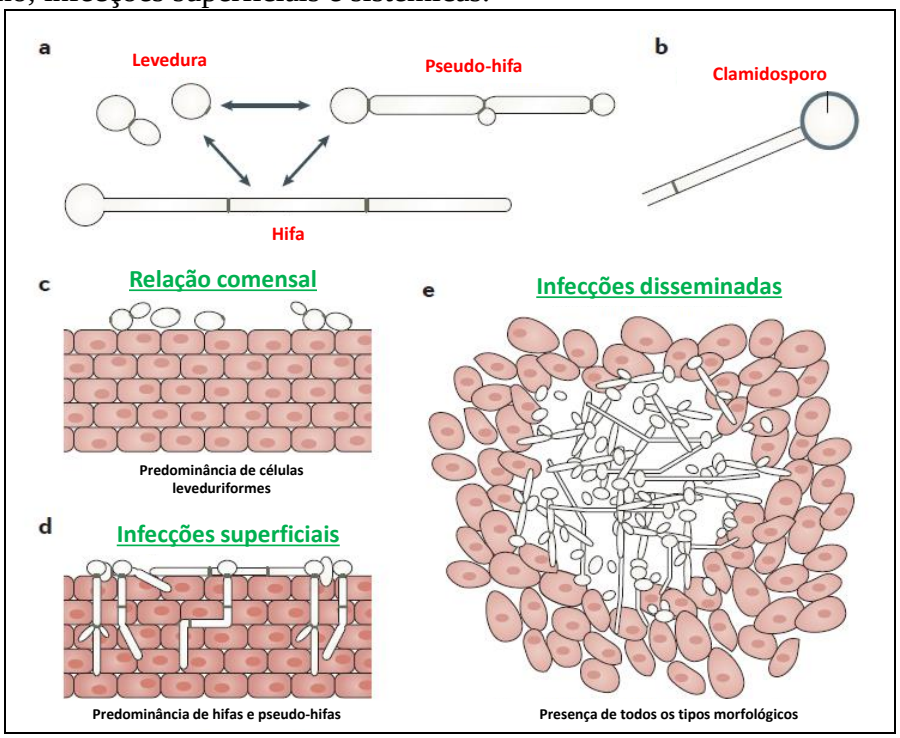
No cenário clínico, a gama de infecções em humanos causadas por integrantes do gênero *Candida* é considerável e merece atenção especial. As manifestações clínicas oriundas de infecções causadas em particular por *C. albicans*, variam desde infecções superficiais, assim chamadas de "micoses superficiais" tais como aftas orais, infecções de pele e mucosas genitais, até o estágio mais agressivo da doença conhecido como "candidemias", nas quais, classificam-infecções sistêmicas e fatais, principalmente em pacientes que já estão imunocomprometidos (MCCULLOUGH; ROSS; READE, 1996; NOBILE; JOHNSON, Alexander D., 2015; NOBLE; GIANETTI; WITCHLEY, 2016)**.**

A fim de entender mais sobre as características e habilidades em desencadear processos patogênicos nos seres humanos, a morfogênese tem sido um foco central de pesquisa em *C. albicans* devido a ligações entre cada um desses tipos de células e importantes interações fungo-hospedeiro.

É conhecido o fato de que as formas filamentosas de *C. albicans* (hifas e pseudo-hifas) são as mais virulentas manifestações celulares relacionadas com a propagação de patogêneses em comparação com o estágio leveduriforme. Diversos estudos demonstraram a capacidade de infestação das hifas em meios sólidos e principalmente sua capacidade de alojar-se em tecidos e órgãos infectados, facilitando a propagação da doença e tornando o tratamento ainda mais complicado. Além disso, as hifas expressam vários fatores de virulência específicos, como adesinas, secreções oriundas de enzimas hidrolíticas como, por exemplo, superóxido dismutase e até mesmo uma toxina peptídica citolítica recentemente descrita (extensão da proteína de alongamento celular 1) (TANG et al., 2016) **.**

A Figura 1 apresenta as características morfológicas apresentadas por *C. albicans* e sua relação nos processos de comensalismo e nos diferentes tipos de manifestações infecciosas.

Figura 1. Diferenças morfológicas e estruturais da espécie *C. albicans* em relações de comensalismo, infecções superficiais e sistêmicas.



(a) Células leveduriformes e em conformação de hifas e pseudo-hifas; **(b)** Clamidósporo vegetativo; **(c)** Presença da forma leveduriformes em relações comensais com o homem; **(d)** presença de células em conformação de hifas e pseudo-hifas em contato com mucosas e/ou tecidos; **(e)** Presença dos três tipos morfológicos da espécie em meio a células individuais mucosas e/ou tecidos em casos de disseminações.
Fonte: adaptado de Noble et al. (2016).

No evento de infecção causado por *C. albicans* em seres humanos e animais, as hifas predominam no sítio primário de infiltração em camadas internas de tecidos epiteliais, enquanto as células leveduriformes são geralmente encontradas na superfície das células epiteliais ou emergindo do meio interno para o externo por meio do brotamento oriundo de hifas que já se infiltraram nos tecidos. Neste momento, a comunicação molecular entre as células fúngicas são moduladas pela densidade populacional através do mecanismo de comunicação celular conhecido como *quórum sensing*, sendo o grande responsável pelo início da modulação que condiciona o aumento desta densidade no organismo vivo, garantindo assim a homeostase necessária para que o equilíbrio entre fungo e hospedeiro seja mantido.

No entanto, existe um limiar para que a quantidade de *C. albicans* seja tolerada de forma comensal pelo hospedeiro para que o equilíbrio da microbiota seja mantido, sendo assim, hospedeiro deve manter a carga fúngica abaixo desse limiar e distinguir células não-patogênicas de *C. albicans* de células invasivas e potencialmente fatais do mesmo fungo para

manter a homeostase, do contrário, é iniciado o processo infeccioso por meio de infestações descontroladas. Este perfil caracteriza esta espécie como um fungo oportunista (GOW et al., 2011).

Um bom exemplo deste evento é o estabelecimento da CVV, uma vez que o desequilíbrio supressivo da flora normal de *Lactobacillus* spp. favorece o desenvolvimento exacerbado de *C. albicans* no ambiente vaginal. Outro fator a ser levado em consideração é a capacidade que esta espécie possui de formar biofilmes no ambiente vaginal, o qual é responsável por manter sua integridade e manutenção populacional, entretanto, se torna mais um problema na terapêutica da doença (SOBEL, 2016a). Uma revisão detalhada para apresentar e explicar a dinâmica envolvida nos biofilmes microbianos está apresentada no item 2.2. e subitem 2.2.1. desta tese.

Apesar dos indiscutíveis avanços no suporte médico para atender os cuidados primários e intensivos sob pacientes altamente debilitados, as manifestações clínicas desencadeadas por leveduras do gênero *Candida* ainda são consideradas de difícil diagnósticos por assimilar-se muitas vezes com aquelas oriundas por infecções bacterianas, o que leva à hospitalização prolongada e exposição a fármacos quimioterápicos de amplo espectro, o que gera uma taxa de mortalidade de cerca de 50% e, consequentemente, classifica-se como um fardo financeiro para os sistemas de saúde (DOI et al., 2016). As candidemias são um problema crescente nos hospitais de cuidados terciários em todo o mundo. Um estudo realizado em 183 centros médicos dos EUA mostrou que espécies de *Candida* são as mais comuns causas de infecções sanguíneas (MAGILL et al., 2014).

Além de ser um patógeno de alta prevalência, a espécie *C. albicans* tem grande impacto em surtos de infecções nosocomiais (surtos infecciosos em hospitais), sendo a responsável por cerca 6,8% das infecções hospitalares nos Estados Unidos no ano de 2013 (RANE et al., 2013), entretanto, o cenário brasileiro também vem sofrendo com as elevadas taxas de infecções por este tipo de levedura. Doi et al. (2016) realizaram um estudo multicêntrico de vigilância em 16 hospitais distribuídos geograficamente em cinco regiões do Brasil a fim de avaliar a incidência, distribuição de espécies, frequência de resistência antifúngica e fatores de risco para infecções sanguíneas por espécies de *Candida*, indicando a alta prevalência desta espécie em todas as unidades empregadas no estudo, entretanto, dados alarmantes referentes ao perfil de resistência por leveduras não-*albicans* também foram apresentados.

A importância médica das infecções por *Candida* e o valor científico e epidemiológico de *C. albicans* no cenário clinico atual estimulam os avanços compreensivos da epidemiologia das candidíases superficiais e invasivas, uma vez que se trata de um micro-organismo complexo e responsável por severos quadros clínicos nos seres humanos. Além disso, a resistência aos antimicóticos atualmente disponíveis encontra-se cada vez mais em expansão, gerando indisponibilidade terapêutica e exposição a fármacos agressivos e com taxas elevadas de efeitos tóxicos. Por conseguinte, o desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos continua a ser uma necessidade crítica, e estimula a manter a busca incessável por medicamentos aplicáveis e com baixos índices de efeitos tóxicos, a fim de trazer novos horizontes no cenário do tratamento de doenças fúngicas, e mais qualidade de vida ao homem.

2.1.1. A candidíase vulvovaginal (CVV)

Devido à natureza íntima das infecções vaginais, este tipo de infecções tendem a permanecer como um "assunto tabu", uma vez que o "assunto em questão" é encarado como desconfortante e de certo modo inadequado de ser discutido abertamente. Neste sentido, as infecções vaginais têm historicamente sido um assunto relativamente inexplorável, e talvez no passado foram consideradas como um problema relativamente pequeno apesar do fato dos sintomas terem um impacto negativo na qualidade de vida das mulheres que sofriam com os sintomas manifestos por esta doença.

De maneira geral, mulheres de diversas faixas etárias estão sujeitas a desenvolverem algum tipo de doença na região vaginal, onde fatores como a indisposição imunológica, falta de higiene adequada, aspectos genéticos e doenças de origem sexualmente transmissíveis caracterizam-se como sendo fatores primordiais para o desencadeamento de patologias. As infecções vaginais são tão prevalentes que representam o motivo mais frequente para que as mulheres busquem consulta médica em especialistas. Estima-se que mais de 70% das mulheres adultas tiveram um problema vaginal e usaram produtos vaginais para tratar infecções (NAPPI; LIEKENS; BRANDENBURG, 2006). Embora não estejam associados a altas taxas de mortalidade, as infecções vaginais são uma causa de morbidade considerável entre as mulheres. Seus sintomas foram associados a diferentes graus de ansiedade e humor depressivo e têm um impacto negativo nas relações sexuais, auto-estima e qualidade de vida das mesmas (PALMEIRA-DE-OLIVEIRA; PALMEIRA-DE-OLIVEIRA; MARTINEZ-DE-

OLIVEIRA, 2015).

Os desencadeamentos de vaginites ocasionadas por micro-organismos são muito comuns, e na maioria das vezes são estabelecidas após contaminação por protozoários, fungos, bactérias e até mesmo vírus. Entretanto, diversas espécies de *Candida* e mais predominantemente *C. albicans* são os patógenos fúngicos responsáveis por uma das principais causas de infecção vaginal em mulheres em idade reprodutiva: a candidíase vulvovaginal (CVV) (SOBEL, 2015). Embora C. *albicans* seja comumente detectada em secreções vaginais de mulheres sem sintomas manifestos, os mecanismos que desencadeiam a transição morfológica fúngica e a subsequente inflamação imune pró-inflamatória associada à CVV são mal compreendidos. No entanto, os fatores de virulência conhecidos, incluindo as fosfolipases e as enzimas proteolíticas que se tornam ativadas durante a infecção, foram bem estudados (SOBEL, 2007).

Desde as observações relatadas por em 1949 por Wilkinson, de que existia certa relação entre a existência de fungos na vagina e o aparecimento de vaginite, os entendimentos e compreensão da CVV foram evoluindo de maneira gradativa. Segundo a organização mundial da saúde (OMS), estima-se que a CVV compreende cerca de 95% das infecções do trato genital feminino, caracterizando-a como uma doença de grande importância, sendo indispensável a realização do diagnóstico para a melhor adequação do paciente ao tratamento (SOBEL, 2016b)

Esta doença caracteriza-se como um problema global que gera uma série de desconfortos físicos para as mulheres. A sintomatologia da CVV depende do nível de infecção e da localização do tecido inflamado, a qual pode manifestar-se isoladamente ou em associação com outros tecidos do ambiente vaginal, no entanto, os principais sintomas envolvem a presença do prurido vulvovaginal que pode variar como ardor ou dor à micção urinária, corrimento branco, grumoso, inodoro e com aspecto caseoso, hiperemia, edema vulvar, fissuras e maceração da vulva, dispareunia e presença de placas brancas ou branco-acinzentadas na vagina, colo do útero e também aderidas à mucosa. Além destes, o comprometimento do colo uterino com presença de lesões erosivas, escoriações e fissuras também fazem parte das manifestações clínicas desta doença. Em vista destas afirmações, os sintomas recorrentes das infecções continuam a ser um desafio para as mulheres, pois tem um impacto claramente negativo na qualidade de suas vidas (ADOLFSSON et al., 2017).

Mulheres portadoras da CVV podem apresentar um ou mais episódios infecciosos de

forma esporádica ou ocasional, podendo estes estar diretamente relacionados aos fatores imunológicos e nutricionais da paciente, enquanto outras podem ter sintomas frequentes ou graves colocando-as em um patamar de risco elevado, onde a patogênese passa a ser chamada de candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR). Este estágio da doença classifica-se como o mais importante em termos de manifestação clinico-patológico, uma vez que episódios mais frequentes são observados, sendo comum a manifestação dos sintomas através de quatro ou mais episódios durante o ano (SOBEL et al. 2015).

As principais causas do estabelecimento podem estar ligadas a diferentes eventos, entretanto, fatores como a resistência antifúngica aos fármacos empregados na terapêutica, predisposição genética, fatores interferentes tais como disfunções oriundas do contato com a prostaglandina E2 presente no sêmen masculino, aumento da produção de citoquinas Th2 e produção insatisfatórias de Th1, e também o uso de pílulas anticoncepcionais. (SOBEL, 2016a).

Um estudo estatístico recente mostrou que as manifestações clínicas da CVVR podem levar a depressão e ansiedade nas mulheres acometidas uma vez que possuem um efeito profundamente negativo na qualidade de vida, devido à sua natureza crônica e recorrente afetando diretamente seu bem-estar. Adicionalmente, a prevalência de diversos eventos infecciosos de coloca as mulheres em um elevado patamar de risco para o desenvolvimento de neoplasias na região cervical (ADOLFSSON et al., 2017).

O cenário epidemiológico dos casos de CVVR é alarmante e desperta interesse na comunidade científica a fim de quantificar dados e promover estratégias terapêuticas. Um estudo desenvolvido por pesquisadores brasileiros realizados com 669 mulheres não diabéticas envolvidas em triagens rotineiras de câncer na região cervical relatou que 8,2% das pacientes analisadas apresentaram diagnóstico positivo para a CVV, entretanto, 20% destes (1,6% em geral) relataram a ocorrência de 4 ou mais episódios da doença (GUNTHER et al., 2014). Mais recentemente, um estudo realizado nos Estados Unidos da América (EUA) constatou que 6,3% num total de 2391 mulheres americanas relataram quatro ou mais episódios de CVV no ano 2016 (BLOSTEIN et al., 2017). Estes dados mostram que a prevalência CVVR é crescente e de caráter global.

2.1.1.2. A terapêutica da CVV e CVVR

Ao contrário do arsenal terapêutico disponível para o tratamento das doenças infecciosas desencadeadas por espécies bacterianas, o cenário da terapia das doenças fúngicas apresenta certa escassez e limitações. Em muitos casos, a falta de acurácia no diagnóstico leva a um número significativo de mulheres rotuladas como portadoras de infecção recorrentes e tratadas contra uma suposta patologia que, na realidade, não estava associada ao agente etiológico responsável, o que contribui para o desencadeamento da resistência antimicrobiana (FEUERSCHUETTE et al., 2010).

Em termos clínicos e farmacológicos, a terapia da CVV pode ser classificada em tratamento aplicado às "infecções não complicadas" e "infecções complicadas", sendo a ultima associada com casos mais agressivos da doença, como os episódios de CVVR (SOBEL et al., 2016a).

Na rotina clínica, o diagnóstico da CVV é frequentemente realizado através exames clínicos, os quais garantem o sucesso da terapia a ser escolhida. O exame microscópico do muco vaginal é um importante aliado aos médicos ginecologistas para ser utilizado como parâmetro inicial de diagnostico, uma vez que o micélio fúngico pode ser visto sob microscopia em cerca de 50 a 80% dos casos. Outro teste corriqueiramente utilizado é o chamado "teste do cheiro", no qual, uma solução de 10% de hidróxido de potássio é adicionado ao muco vaginal coletado e é possível distinguir entre CVV e vaginose bacteriana (VB), uma vez que em casos de VB um odor semelhante a uma amina é liberado após esta reação e, consequentemente o teste é negativo nos casos de CVV. A elucidação do pH vaginal também pode ser utilizada como um dos métodos diagnósticos, uma vez que mulheres com CVV geralmente possuem pH vaginal extremamente ácido (inferior a 4,5) e, em casos de VB, o pH é superior a 4,5. Entretanto, o conjunto destes fatores, somados a um exame microbiológico de cultura do fluido vaginal a fim de identificar a presença e espécie de *Candida* no evento de infecção, é a etapa crucial para o sucesso da terapia da doença, uma vez que com resultados precisos a respeito da espécie causadora pode-se direcionar o clínico para a escolha do melhor método terapêutico a ser empregado (ACHKAR; FRIES, 2010; DOVNIK et al., 2015). Além disso, a realização de ensaios de sensibilidade aos antimicrobianos pode mostrar a escolha do antibiótico eficaz para casa tipo de infecção.

O arsenal terapêutico para o tratamento da CVV conta com quatro principais classes

medicamentosas disponíveis, sendo eles: derivados de azóis, poliênicos, alilaminas e equinicandinas (DOVNIK et al., 2015).

Os fármacos de primeira escolha para o tratamento de infecções desencadeadas por fungos são os derivado da classe dos azóis, tais como àqueles organizados por estruturas de imidazóis e triazóis, a exemplo, destaca-se o fluconazol, cetoconazol, clotrimazol, itraconazol dentre outros (ODDS; ALISTAIR; GOW, 2003).

Embora o primeiro relatório sobre a atividade antifúngica do benzimidazol, um composto derivado dos azóis, tenha sido descrito em 1944 pela Woolley Pharmaceutica, somente após o ano de 1958 que os pesquisadores se interessaram pela atividade antifúngica de compostos azólicos devido aos bons resultados apresentados pelo clotrimazol. A partir daí, no final da década de 1960, foram introduzidos três novos compostos tópicos para o tratamento de afecções fungicas: clotrimazol, desenvolvido pela Bayer Ag (Alemanha), miconazol e econazol, ambos desenvolvidos pela Janssen Pharmaceutica (Bélgica).

A terapêutica disponível para a CVV não evoluiu gradativamente desde meados da década de 80. Nesta época os agentes tópicos aprovados pela US Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento desta doença incluía os fármacos nistatina, miconazol e clotrimazol. Todavia, devido aos altos índices de efeitos adversos oriundos da administração oral destes medicamentos além de parâmetros farmacocinética imprevisíveis como resultado da indução de enzimas microssomais hepáticas, limitou-se o uso dos mesmos, especialmente o clotrimazol no tratamento tópico de infecções dermatófitas e infecções de superficiais causadas por *Candida* ssp., incluindo candidíases orais e vaginais (MAERTENS, 2004). Entretanto, após este período, o butoconazol e o terconazol foram inseridos na terapêutica como três novos agentes antifúngicos de administração tópica e apresentavam excelentes taxas de cura da infecção.

Estes fármacos foram desenvolvidos em meados de 1980 e implantados na terapia clínica no início dos anos 1990 sendo considerados na época como um grande avanço na área clinica, que vivia constantemente com o avanço expressivo das doenças fúngicas locais e sistêmicas em pacientes imunocomprometidos, em especial, os portadores do HIV (CANUTO; RODERO, 2002). Em vista disso, os fármacos miconazol e clotrimazol, anteriormente disponíveis apenas com receita médica, foram disponibilizados de maneira livre para compra, ou seja, sem necessidade previa de acompanhamento médico e farmacêutico. A importância deste evento remete aos dias de hoje a dura realidade que enfrentamos no

tratamento, uma vez que o uso exacerbado destes medicamentos conferiu perfil de resistência aos mesmos, o que gerou um aumento dos sintomas e prevalência da infecção em muitas mulheres naquela época (REEF et al., 1995; DOVNIK et al., 2015).

O principal mecanismo de ação dos fármacos derivados de azóis é inibir enzimas do citocromo P-450 em organismos fúngicos. Estas enzimas estão presentes na maioria das células vivas, incluindo bactérias, leveduras, fungos, protozoários, plantas, insetos e vertebrados. Nas células eucarióticas, estas enzimas são componentes integrantes do retículo endoplasmático liso ou membrana mitocondrial interna que desempenham um papel fundamental nas reações metabólicas e desintoxicantes, as quais interagem com muitos compostos importantes, incluindo esteróis, esteróides, ácidos biliares, fenóis, alcenos, epóxidos, sulfonas e vitaminas solúveis. A principal enzima inibida pelos azóis é a 14α-desmetilase que é responsável pela conversão de lanosterol em ergosterol, sendo este o principal componente da membrana celular fúngica (SOBEL, 2007).

A terapêutica empregando os fármacos pertencentes a esta classe vem sofrendo declínio na clínica devido ao perfil de resistência de muitas espécies de *Candida*. Adicionalmente, uma das maiores limitações destes medicamentos é o risco de desenvolvimento de teratogênese fetal, sendo assim, são contraindicados durante a gravidez e tornam-se altamente prejudicial para mulheres que estejam em idade fértil e que queiram engravidar. Este perfil expõe diversas mulheres a tratamentos mais invasivos baseados no uso de antifúngicos com altas taxas de efeitos tóxicos (SOBEL, 2016).

As alilaminas são outra classe de antifúngicos disponível em prática clinica, seu principal mecanismo de ação baseia-se na inibição da enzima esqualeno epoxidase o que gera a diminuição da concentração de ergosterol, provocando um aumento da permeabilidade celular fúngica e interrupção da organização celular. A exemplo de fármacos derivados desta classe encontram-se a amorolfina, butinafina, naftifina e terbinafina, sendo o ultimo destes o principal agente terapêutico para uso clinico. A terbinafina possui uma maior margem de segurança uma vez que, diferente dos derivados de azóis, não atua no citocromo P- 450, sendo mais seletiva que os derivados do grupo azol, como o cetoconazol, apresentando baixa interação entre os fármacos (ADWAN; SALAMEH; ADWAN, 2012).

A terbinafina é uma alilamina sintética utilizada por via tópica ou oral no tratamento de infecções fúngicas superficiais e sistêmicas. Diversos estudos mostram os efeitos tóxicos atribuídos ao uso destes medicamentos, a exemplo, têm-se os efeitos nefrotóxicos causados

pela sobrecarga nos rins, uma vez que as dosagens terapêuticas padronizadas são altas, e principalmente a capacidade de desencadear erupções cutâneas graves nos pacientes que utilizam esta droga. Recentemente, um estudo desenvolvido na Inglaterra relatou a influencia do uso deste medicamento com o aparecimento de graves erupções cutâneas em pacientes que estavam em tratamento (JANJUA et al., 2017). Outro fato importante a ser levado em conta no tratamento da CVV com este medicamento é a propriedade fungistática que ele exerce sobre cepas de *C. albicans* o que impossibilita o uso deste medicamento em casos mais graves da doença (LAM et al., 2016).

Os poliênios são antibióticos sintetizados por bactérias pertencentes ao gênero *Streptomyces* e são classificados como outra classe de medicamentos disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas, em especial para aquelas desencadeadas por *Candida* spp. Dentro desta classe destaca-se o fármaco anfotericina B (AMB), descoberto em 1956 por Gold e colaboradores. O preciso mecanismo de ação deste fármaco ainda gera controvérsias na área científica, no entanto, sabe-se que seu modo de ação é atípico para uma molécula antimicrobiana, uma vez que ao invés possuir o mecanismo de inibição enzimática, tais como os fármacos derivados de azóis, ele possui a capacidade de ligar-se ao ergosterol, sendo este o ergosterol majoritário da constituição da membrana fúngica. Como resultado desta ligação, desencadeia-se um processo de perturbação no funcionamento da membrana celular promovendo a lise e, consequentemente, o extravasamento do conteúdo celular (ODDS ALISTAIR; GOW, 2003; PFALLER, 2012).

A molécula de ergosterol presente na membrana fúngica possui uma estrutura tridimensional cilíndrica, diferentemente do colesterol, o principal esterol presente na constituição das membranas celulares de mamíferos, as quais possuem forma sigmoide. As diferenças conformacionais existentes entre estas membranas foi o passo primordial para a que a ideia da seletividade fúngica fosse proposta, Entretanto, com o passar dos anos foi constatado que esta seletividade é baixa e estudos relacionados com a toxicidade de AMB foram desenvolvidos para garantir a segurança do tratamento no passar dos anos (DOUGLAS, 2003; SPANAKIS; APERIS; MYLONAKIS, 2006; TEVYASHOVA et al., 2013). A AMB é tóxica para células de mamíferos e causa reações de nefrotoxicidade particularmente nos seres humanos, e este perfil limitou o uso deste fármaco de maneira sistêmica.

Embora o perfil nefrotóxico de AMB tenha sido um desastre na época, seu papel como potente antifúngico devia ser mantido, sendo assim, uma variedade de versões reformuladas

do agente foram investigadas e introduzidas no mercado farmacêutico como uma estratégia de diminuir este perfil. As versões mais bem sucedidas, clinicamente comprovadas, baseiam-se em formulações farmacêuticas sintetizadas a partir de combinações de lipídeos, encapsuladas em lipossomas ou em complexos lipídicos (AVERSA et al., 2017).

As equinocandinas compreendem-se como a classe de agentes antifúngicos mais atual lançada no mercado. Obtidos a partir do caldo de fermentação de vários fungos, estes produtos naturais são compostos por um hexapeptídeo cíclico altamente oxigenado ligado a uma cadeia lateral lipofílica. Os membros desta classe incluem equinocandinas B-D, anidulafungina, caspofungina e micafungina. No cenário clínico, as equinocandinas são empregadas no tratamento de infecções fúngicas sistêmicas, principalmente em pacientes imunocomprometidos em ambiente hospitalar. O principal mecanismo de ação baseia-se na inibição da síntese de glicanos na parede celular inibindo a enzima 1,3-β-glicano sintase. Estes medicamentos possuem uma poderosa atividade fungicida contra espécies de *Candida*, incluindo as cepas predominantes de não-*albicans* que se tornaram clinicamente problemáticas nos últimos anos (RENSLO, 2007).

O espectro antifúngico desta classe é restrito a *Candida* e *Aspergillus*. São fungicidas *in vitro* e *in vivo* contra quase todas as espécies de *Candida* e fungistático contra espécies de *Aspergillus*. A concentração inibitória mínima necessária com os agentes desta classe é bem menor em comparação com a anfotericina e o fluconazol em todas as espécies de *Candida*. As equinocandinas têm baixa toxicidade em comparação com outros antifúngicos. Estudos mostram que reações adversas tais como febre, calafrios e flushing ocorrem em menos de 1% dos pacientes e podem ser minimizados reduzindo-se a velocidade de administração do fármaco, entretanto, outros efeitos como vômitos e flebite foram relatados, além da elevação de enzimas hepáticas em 11 a 24% dos pacientes tratados. Visto a este fenômeno, e a escassez de estudos que comprovem o efeito hepatotóxico de fármacos pertencentes a esta classe, tais como a caspofungina, uma monitoração de enzimas hepáticas durante o período de administração da droga deve ser feita para garantir a segurança do paciente (MOUDGAL; SOBEL, 2003; BOIKOV et al., 2017).

Embora as equinocandinas sejam as drogas mais eficazes disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas ocasionadas por espécies multirresistentes, e a última estratégia terapêutica nos dias de hoje, relatos na literatura científica já apresentam casos de estirpes resistentes a derivados destes fármacos. Um estudo realizado nos EUA

mostrou a incidência de cepas de *C. glabrata* que estão adquirindo resistência a esta classe de agentes terapêuticos. Neste trabalho, estirpes com perfil resistente ao fluconazol isoladas de amostras de sangue de 313 pacientes com foram submetidas ao tratamento com os fármacos anidulafungina, caspofungina e micafungina, os resultados foram alarmantes e mostraram altos índices de cepas resistentes a estes fármacos (ALEXANDER et al., 2013). No ano seguinte, o estudo realizado por Bizerra e colaboradores evidenciaram o primeiro caso de resistência à equinocandinas no Brasil, ilustrando ainda, a relevância de realizar atividades de vigilância contínua para identificar mudanças nas taxas de incidência, populações suscetíveis, agentes etiológicos, e a implementação de políticas de monitoramento mais consistentes no que se diz respeito ao perfil de resistência aos antifúngicos no território nacional (BIZERRA et al., 2014). Desde então, novos estudos apresentando casos de resistência foram publicados (PERLIN, 2015; BOIKOV et al., 2017).

De maneira geral, o emprego de fármacos no tratamento da CVV envolve uma intensa terapia de indução com antifúngicos em altas doses, seguida de um longo período de manutenção, entretanto, existem muitas variações, apesar de ser o tratamento padrão. Todavia, estes tratamentos expõem mulheres a diversos tipos de efeitos colaterais o que remete diretamente no bem-estar físico e psíquico das mesmas. Estas afirmações são as bases para que a busca por substancias bioativas aplicáveis ao tratamento da CVV sejam mantidas, encorajando pesquisadores de todo mundo a buscarem fontes promissoras de moléculas com potencial antifúngico.

2.2. Biofilmes microbianos

O uso de vacinas e antibióticos para fins profiláticos e terapêuticos vem sendo empregado de maneira formidável ao longo dos anos em casos infecciosos agudos, os quais, em sua maioria, são desencadeados por células microbianas presente no organismo humano na forma planctônica (células individuais). No entanto, assim como todo ser vivo, os micro-organismos desenvolvem estratégias de para garantir sua sobrevivência e adaptação ao stress ambiental, com isso, cooperam-se entre si desenvolvendo uma coesa e robusta comunidade de células com forte comunicação intercelular, assim denominado de biofilme (FUX et al., 2005; APARNA; YADAV, 2008; JONES, 2008).

Desde as observações feitas por Antony Van Leeuwenhoek ao relatar a presença de

"pequenos animais" em uma amostra do seu próprio dente vivendo de forma isolada e em conjunto, a idéia de biofilme vem sendo descrita de diversas maneiras. No ano de 1943 Zobell fez o primeiro relato detalhado sobre os biofilmes onde iniciou estudos sobre a adesão de bactérias marinhas em cascos de navios e em diferentes tipos de superfície que incluíam vidro, metal e plástico que estavam submersas. Em 1978 através dos estudos de Costerton e colaboradores empregando técnicas mais sofisticadas de microscopia confirmaram que a maioria dos micro-organismos vive e se reproduz em "agregados poulacionais". Desde então, estudos têm revelado que a maioria dos micro-organismos não cresce como células individuais, mas em comunidades estruturadas como organismos multicelulares ou biofilmes, estando presentes em praticamente todos os ecossistemas naturais e patogênicos (RAMAGE et al., 2009).

A definição concreta e mais precisa do termo "biofilme microbiano" tem evoluído ao longo dos anos, sendo assim, para determinar com clareza este termo que envolve inúmeros fatores deve-se considerar muito mais do que suas características facilmente observáveis. No entanto a ciência moderna classifica os biofilmes microbianos como um sistema biológico formado por comunidades heterogêneas (diversidade de espécies, ex. bactérias e fungos vivendo em simbiose) de células microbianas agregadas, organizadas e funcionais embebidas em matriz extracelular composta por substâncias poliméricas produzidas pelas próprias células, a qual possibilita a aderência irreversível a superfícies bióticas ou abióticas. Além disso, algumas propriedades importantes devem ser consideradas, como a taxa de crescimento microbiano alterada e o fato de que os micro-organismos em biofilme transcrevem genes com padrão diferenciado daqueles observado em células planctônicas (BJARNSHOLT, 2013; BURMØLLE et al., 2014; AZEREDO et al., 2017;).

A matriz EPS é um material extracelular produzido principalmente pelos próprios micro-organismos formadores do biofilme, sendo composta especialmente por ácidos nucléicos, proteínas extracelulares, fosfolipídeos, ácido teicóico e exopolissacárideos. É possível encontrar também cristais minerais, partículas de sedimentos, resíduos de leite e, por vezes, componentes do sangue ou sujeira devido às diferentes condições e locais em que os biofilmes podem ser formados (COSTERTON et al., 1995; HELENA et al., 2017). As interações moleculares entre as EPS não são ainda bem definidas para os seus diferentes componentes e as contribuições dessas substâncias para a integridade da matriz ainda não são compreendidos em um nível molecular. Entretanto diversas funções da EPS foram

determinadas, e demonstraram que são muito vantajosas para o modo de vida dos biofilmes (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

Os biofilmes podem formar-se naturalmente em qualquer superfície sólida em contato com água, como tecidos vivos, dispositivos médicos e sistemas de água. Na maior parte das superfícies sólidas, os biofilmes se formam com espessuras da ordem de milímetros ou mesmo micrômetros; entretanto, a espessura de alguns biofilmes pode atingir vários centímetros, como no caso dos tapetes de algas (XAVIER et al., 2003).

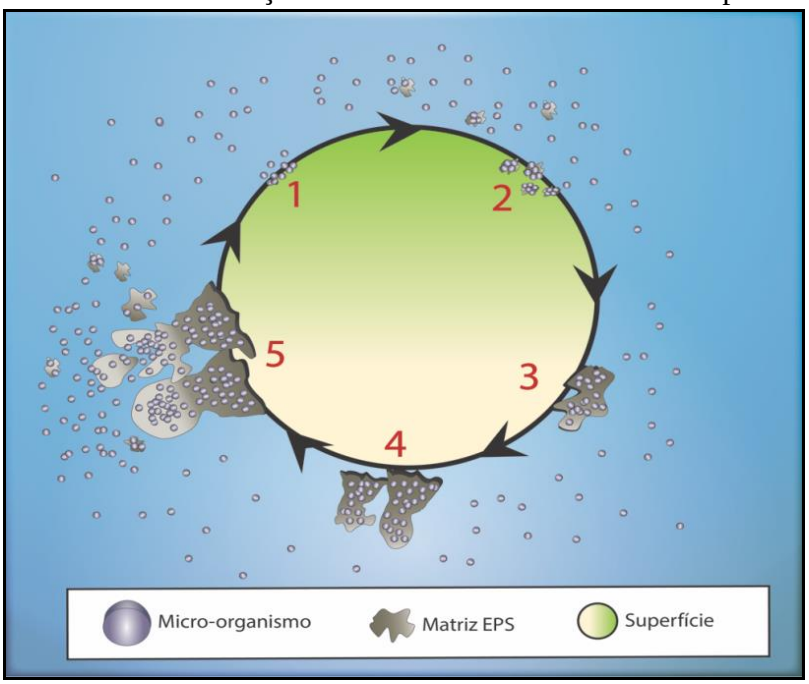
No ambiente e até mesmo em superfícies abióticas é muito encontrar micro-organismos vivem em biofilmes comensalmente com outras espécies, sendo assim são chamados de biofilme multiespécie (D'ACUNTO et al., 2015). Bactérias e fungos são capazes de formar biofilmes em superfícies, entretanto, alguns fatores envolvidos durante o decorrer do processo de formação diferem a dinâmica geral um do outro.

Os estudos realizados por Almeida e França (1998) e Percival e colaboradores (1998) demonstraram que os biofilmes não são estruturas homogêneas, sendo eles constituídos por uma fase descontínua sobre a superfície do suporte, onde há a existência de áreas de alta densidade de células com espaços onde não existe colonização, além disso os autores afirmaram que existe também uma grande diversidade na morfologia das células presentes, tais como organismos filamentosos, formas espiraladas, bastonetes, cocos e bacilos (ALMEIDA; FRANÇA, 1998; PERCIVAL et al., 1998).

A grande preocupação da ciência em relação à aderência e proliferação de micro-organismos em superfícies se faz principalmente na utilização de materiais que dificultem tal evento. A área médica, com ênfase em cirurgia, se empenha em utilizar materiais que dificultem e/ou inibam tais eventos, sendo assim, entre os materiais utilizados para a confecção de aparatos cirúrgicos destacam-se aqueles produzidos a partir de aços inoxidáveis resistentes à corrosão, fadiga e fratura. Todo este cuidado é devido a capacidade exercida pelos biofilmes em se proliferar e fixar-se em superfícies porosas e ásperas (BUSSCHER; MEI, 2006).

De maneira geral o desenvolvimento de um biofilme microbiano em superfícies bióticas e abióticas é um processo dinâmico que envolve etapas de adesão, crescimento, e produção de matriz extracelular (PERCIVAL, 2017). Para esta formação, existe um ciclo composto geralmente por cinco estágios sequenciais, o qual está representado na Figura 2.

Figura 2. Processo cíclico de formação de biofilmes microbianos em superfícies.



Onde: 1=Deposição inicial de células planctônicas, **2**= adesão reversível, **3**= adesão irreversível, **4**= maturação, **5**= desprendimento.

Fonte: O autor

Estágio 1: Considerada como aprimeira etapa de formação do biofilme, tem-se a deposição inicial de células planctônicas livres no substrato de adesão, é a chegada inicial das células micobianas ao substrato de adesão. Neste estágio ainda é possível verificar a presença de macromoléculas que compõe o chamado filme condicionante que servem de substrato para que as células microbianas iniciem os processos de formação do biofilme (HABIMANA; SEMIÃO; CASEY, 2014).

Estágio 2: Denominada como fase de adesão reversível, neste estágio as células microbianas iniciam o processo de adesão e iniciam o processo de comunicação entre si que serão repsonsáveis por desencadear as etapas subsequentes. Entretanto, é possível ocorrer o desprendimento das mesmas, uma vez que as células estão fracamente ligadas ao substrato, Adicionalmente, embora em pequena quantidade, pode-se observar a presença de matriz EPS sendo formada e acondicionando as células previamente aderidas (DUNNE, 2002).

Estágio 3: Após a adesão inicial das células à superficie, as células microbianas que ainda possuem fracas ligações na superfície em que estão aderidas consolidam o processo de adesão, através de uma elevada produção de EPS, a partir daí ocorre um aumento da taxa de reprodução. A matriz também atua como um centro de reciclagem, mantendo todos os

componentes de células lisadas disponíveis, incluindo o DNA (ácido desoxirribonucleico), o que pode representar um reservatório de material genético para a transferência horizontal de genes. As EPS também podem servir como uma fonte de nutrientes, apesar de alguns componentes se degradarem. Vale ressaltar que essa degradação ocorre lentamente, devido à complexidade das EPS, já que a eliminação completa de todos os componentes requer uma vasta gama de enzimas. Além de todos estes fatores, a matriz protege os micro-organismos contra a dessecação, oxidação, proteção contra substâncias biocidas, alguns antibióticos e cátions metálicos, radiação ultravioleta e contra a resposta imunológica, além da sua utilização como meio de fixação. É a produção da matriz a base do sucesso notável das comunidades de biofilme, já que esta permite a propagação e a sobrevivência das células no seu ambiente local (GARRETT; BHAKOO; ZHANG, 2008).

Estágio 4: Conhecida como a etapa de maturação ou manutenção do biofilme. Nesta fase toda dinâmica entre as células microbianas já está bem estabelecida e a arquitetura do biofilme é "moldada". Ocorre uma grande colonização e o crescimento de novas células (replicação) gerando assim um intenso mecanismo de comunicação através de moléculas de sinalização (*quorum sensing*). O este mecanismo permite que as células individuais se comuniquem e coordenem suas ações através da produção e da detecção de moléculas de sinalização extracelulares, que são chamados de auto indutores, sendo elas as responsáveis pelo substrato que é levado pra dentro do biofilme. Além disso, outros organismos podem aderir-se a nesta etapa formando um biofilme multiespécie (SIMÕES, Manuel, 2011).

Estágio 5: É a etapa de desprendimento das células do interior do biofilme. A densidade populacional torna-se tão grande a ponto de gerar a liberação das células acondicionadas na matriz para o meio externo, neste sentido, células planctônicas são lançadas novamente no ambiente circundante e são capazes de iniciar o ciclo novamente (RAMOS et al., 2018).

Alguns fatores como a concentração de nutrientes no meio, temperatura, pH, velocidade do fluxo do ambiente em que o biofilme esta inserido, as cargas genéticas e tipos de células microbianas ali presente são primordiais para a formação e sobrevivência do biofilme (O'TOOLE; KOLTER, 2000). Uma elevada concentração de nutrientes é importante para que o meio favoreça o desenvolvimento e a formação do biofilme, considerando o grande número de células ali presentes, assim como temperatura e pH ideais para a reprodução das espécies que formaram a estrutura. Entretanto, algumas espécies microbianas possuem a

capacidade de se reproduzir e sobreviver mesmo em condições de escassez. Além disso, a velocidade do fluxo pode determinar a facilidade de desprendimento das células e o volume do biofilme formado, uma vez que em ambientes que possuem baixa velocidade de fluxo a formação de estruturas mais volumosas são facilitadas. Todavia, quando este fluxo está presente em velocidade mais elevada, o biofilme fica mais denso e menos volumoso (JAHID et al., 2015).

Entretanto, o real mecanismo que garanta o entendimento completo sobre a formação de biofilmes ainda é desconhecido e será tema de investigação na área científica por muitos anos. O que se sabe é que sua composição e os mecanismos envolvidos estão diretamente ligados ao índice de resistência e virulência por parte dos micro-organismos.

2.2.1. Biofilmes de *C. albicans:* arquitetura e características especiais

De fato, a espécie *C. albicans* é a mais descrita na literatura como potencial patógeno fúngico formador de biofilme, neste sentido, trata-se do principal alvo de estudos na médica uma vez que é considerada a terceira principal causa de infecções intravasculares relacionadas com contaminação em cateteres, dentre outros tipos de infecções (HERWALD; KUMAMOTO, 2014; RAMAGE et al., 2009). Entretanto, é valido salientar que diferentes espécies do gênero *Candida*, tais como as espécies *C. tropicalis, C. krusei, C. glabrata* e *C. parapsilosis* também são capazes de desenvolver biofilmes, e esta característica está diretamente associada a desencadeamentos de injúrias ao organismo humano (CHANDRA; MUKHERJEE, Pranab K.; GHANNOUM, 2012).

Assim como no caso das bactérias, as células leveduriformes e filamentosas de fungos possuem o potencial de desenvolvimento na natureza nos fenótipos na forma planctônica e na forma séssil. Segundo Ramage e colaboradores (2012) no fenótipo séssil (biofilme) existe o desenvolvimento de um grupo de cepas sob uma matriz polimérica rica em canais em toda sua extensão que permitem a passagem de nutrientes e oxigênio, além de conferir proteção contra as respostas imunológicas do hospedeiro e dificultar a difusão dos antimicrobianos utilizados na terapêutica. Além disso, visto ao fato dos fungos serem eucariotos e por essa razão são seres mais complexos que as bactérias, as infecções associadas aos biofilmes fúngicos são difíceis de serem diagnosticadas e tratadas adequadamente, devido a isso, o estudo destes biofilmes tem sido amplamente evidenciado nos últimos anos (MICELI; DÍAZ; LEE, 2011;

MITCHELL et al., 2015)

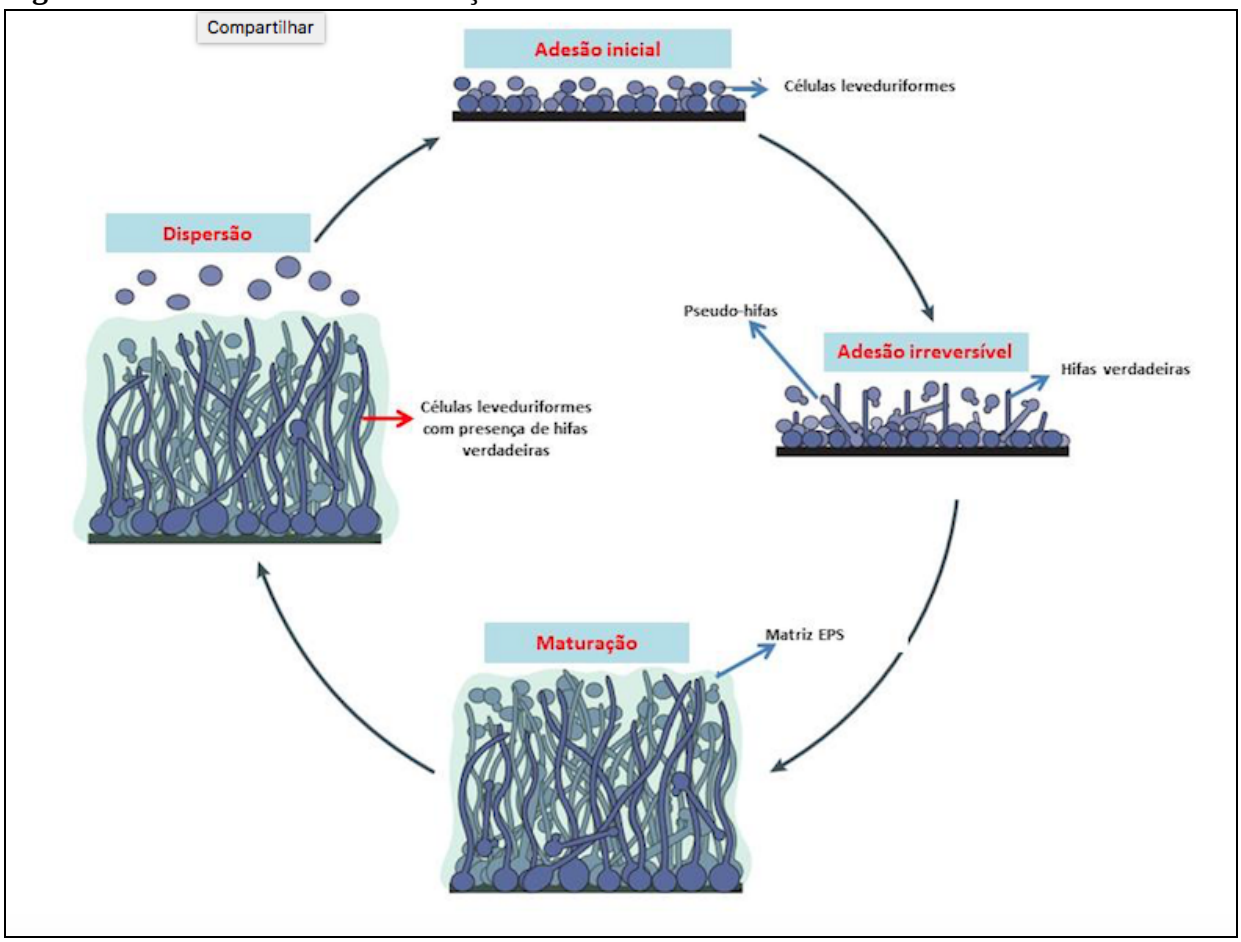
A formação sequencial de um biofilme fúngico foi durante muitos anos descrita da mesma maneira que na formação de biofilmes bacterianos, todavia, com o aprofundamento de estudos relacionados com a dinâmica envolvida na genética e envolvimento dos fungos com os hospedeiro e meio ambiente mudou este cenário.

De maneira geral, mantém-se a ideia do ciclo de formação descrito anteriormente neste documento (adesão primária, adesão irreversível, maturação e dispersão), porém, de acordo com as características diferenciais que os fungos apresentam, principalmente por serem seres eucariotos, modificações dinâmicas podem ser encontradas, uma vez que espécies pertencentes ao genro *Candida* possuem hifas ou pseudo-hifas que atuam na sua proliferação e desenvolvimento, implicando diretamente no estabelecimento do biofilme (MAYER et al., 2013). As formas filamentosas (hifa e pseudohifa) das espécies de *Candida* tem demonstrado aumento da resistência à fagocitose quando comparado com a levedura. Neste sentido, a virulência de *C. albicans* está estritamente relacionada com a capacidade de formação de hifas, sendo esta transição levedura-hifa crucial para o desenvolvimento da infecção e formação do biofilme (TSANG; BANDARA; FONG, 2012).

Os modelos de formação sequencial de biofilmes fúngicos descrito por Douglas (2003) e Lohse et al. (2017) podem ser empregados para entender a sequência de formação e características deste tipo de biofilme. Nestes estudos os autores empregaram *C. albicans* como modelo, e afirmaram que embora o biofilme desta espécie apresente várias semelhanças com os biofilmes de bactérias, a presença de hifas e pseudo hifas é considerado como o fator primordial e diferencial. O modelo proposto abrange 5 etapas: 1- adsorção das células leveduriformes em uma superfície (biótica ou abiótica); 2- aderência à superfície; 3- formação de microcolônias de leveduras e nesta etapa se tem o estímulo inicial para o crescimento e desenvolvimento das hifas, seguida pela formação de microcolônias na camada superior predominantemente formada por hifas e na produção de matriz extracelular polissacarídica (EPS) que compõe estas microcolônias; 4- maturação do biofilme; 5- dispersão das células presentes do biofilme maduro, dando possibilidade do ciclo se iniciar novamente (DOUGLAS, 2003; LOHSE et al., 2017).

A Figura 3 apresenta o processo cíclico de formação do biofilme de *C. albicans*, ilustrando as diferenças conformacionais relacionadas com a presença de hifas e pseudo-hifas.

Figura 3. Processo cíclico de formação de biofilmes de *C. albicans*.



Fonte: Adaptado de Lohse et al. (2017).

Como apresentado na Figura 3, os biofilmes de *C. albicans* possuem uma estruturação conformacional mais robusta e densa, uma vez que hifas verdadeiras e pseudo-hifas estão presentes e desempenham um papel fundamental nesta arquitetura. Em especial, nota-se que no estágio de adesão irreversível ocorre a evolução das leveduras para os morfotipos de hifas verdadeiras e pseudo-hifas, o que se classifica como o estágio crucial para a elaboração de um biofilme mais robusto e consequentemente com complexidade relativa. Esta característica está intrinsicamente relacionada com algumas das dificuldades em se tratar este tipo de biofilme (LOHSE et al., 2017).

De maneira geral, toda a arquitetura dos biofilmes é altamente ordenada para permitir a perfusão de nutrientes e expulsão de resíduos que não são de interesse para as células microbianas. Por apresentarem uma alta densidade populacional, os biofilmes maduros exibem heterogeneidade espacial com microcolônias e presença de canais de água, sendo

estas características comuns nos tipos de biofilmes bacterianos e fúngicos (RAMAGE et al., 2012).

O *quórum sensing* (QS) é um importante mecanismo relacionado com a comunicação entre as células fúngicas dentro de um biofilme, no qual existe uma importante relação de cooperação entre as células que fornece a capacidade de uma comunicação eficaz promovendo a coordenação do seu comportamento e secreção de moléculas de sinalização (ENJALBERT; WHITEWAY, 2005).

Algumas moléculas sinalizadoras presentes no QS dos biofilmes fúngicos são de extrema importância e vem sendo estudadas. O pioneiro estudo de Hornby e colaboradores (2001) evidenciou o farnesol como a molécula de QS responsável por inibir a formação de hifas de *C. albicans* em fase estacionária. Esta grandiosa descoberta foi a chave para que o diversos estudos pudessem ser desenvolvidos até os dias atuais, em outras palavras, este estudo revolucionou o entendimento e a dinâmica dos biofilmes de *C. albicans* e possibilitou o desenvolvimento de outros estudos (HORNBY et al., 2001; SEMIGHINI et al., 2006; DICHTL et al., 2010; SCHEPER et al., 2008; SHARMA; PRASAD, 2011; LEONHARDT et al., 2015).

Posteriormente ao estudo realizado por Hornby, Chen e colaboradores (2004) caracterizaram o tirosol como uma molécula também envolvida no QS de *C. albicans*, desde então, estas duas moléculas são consideradas como importantes reguladoras do QS desta espécie fúngica (CHEN et al., 2004; SARDI et al., 2014).

O controle dos biofilmes fúngicos tem sido objeto de estudo nos domínios da biotecnologia, micologia, e na área médica em geral, uma vez que estas comunidades são protagonistas tanto da indústria farmacêutica e alimentícia, quanto na saúde pública, por desencadear doenças de extrema complexidade e de difícil adequação do paciente à terapia disponível. No entanto o total conhecimento dos mecanismos relacionados com a dinâmica completa dos biofilmes ainda se mantém como uma um alvo de estudos (RAMOS et al., 2018).

2.2.2. A complexidade envolvida no tratamento e erradicação de biofilmes

Conforme apresentado nas sessões anteriores deste documento, os biofilmes são um problema de saúde pública a nível mundial, e de acordo com toda dinâmica genética e

estrutural que estas comunidades microbianas apresentam, não é de se surpreender que a terapêutica e erradicação das mesmas seja complexa e caracteriza-se como um grande desafio para todas as áreas das Ciências da Saúde. A incidência de infecções causadas por biofilmes microbianos tornou-se um problema crescente para a sociedade, neste sentido, existe um esforço contínuo da indústria farmacêutica para o desenvolvimento de novos produtos para o tratamento de infecções resistentes, uma vez que existe um número limitado de agentes eficazes contra biofilmes (RÖMLING et al., 2014).

Alguns mecanismos de resistência atribuídos às células que compõem a arquitetura dos biofilmes, em especial aqueles oriundos por espécies fúngicas, proporcionam condições favoráveis de sobrevivência e reprodução, o que as torna menos suscetíveis à erradicação quando comparadas aos mesmos micro-organismos sob a forma planctônica (RAMAGE et al., 2012). Além dos mecanismos de resistência exercidos pelas células microbianas que se encontram em forma planctônica como transferência de genes de resistência através de processos envolvidos em QS, produção de enzimas específicas e mutações naturais evolutivas, torna-se importante ressaltar outros mecanismos envolvidos nesta dinâmica que expliquem o aumento da resistência de biofilmes aos agentes antimicrobianos empregados em prática clínica (ROMLING et al., 2014).

Quando os micro-organismos se encontram em estado séssil, ou seja, em forma de biofilme, pode-se considerar este fator como um importante mecanismo de virulência e defesa. O sucesso do tratamento antimicrobiano de uma infecção depende da concentração alcançada no foco infeccioso, sendo que esta deve ser suficientemente alta para inibir a proliferação dos micro-organismos patogênicos. Sendo assim, o antibiótico precisa atingir seu alvo em uma forma ativa promover ligação a este sítio alvo e interferir na sua função. Estudos mostram que a os micro-organismos que estão vivendo dentro de um biofilme possuem um alto padrão de resistência aos antimicrobianos que são ativos contra células da mesma espécie na forma planctônica. Muitas vezes, a concentração inibitória mínima (CIM) necessária para atingir as células microbianas que constituem o biofilme pode ser de 10 a 1000 vezes maior que para sua forma planctônica (DICICCO et al., 2012; MAH, 2012).

Alguns mecanismos de resistência a antibióticos exercidos por micro-organismos que estão em biofilmes biofilme têm sido propostos e o primeiro, principal e mais estudado mecanismo envolve a matriz EPS, a qual é classificada como uma barreira física e química que dificultam a ação de antibióticos além de gerar proteção contra os ataques da resposta

imune do hospedeiro e outros tipos de organismos, além disso, fornece resistência a estresse térmico, força mecânica e promove limitações no uso de sanitizantes (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

Os micro-organismos que se encontram em biofilmes, em especial aqueles presentes nas camadas mais internas, apresentam reduzidas taxas metabólicas e de crescimento e a matriz EPS age como um adsorvente diminuindo a quantidade de fármaco disponível para interagir com as células do biofilme, adicionalmente esta matriz pode reduzir fisicamente a penetração do agente antimicrobiano (GILBERT; ALLISON; MCBAIN, 2002). Este fator pode ser considerado uma vez que os poros existentes na matriz EPS são muito pequenos e devido a isso bloqueiam a passagem das moléculas dos fármacos que, por ventura, venham a apresentar tamanho superior, além disso, pode ocorrer a adsorção dos antimicrobianos na própria matriz devido a sua característica muitas vezes aniônica e hidrofílica, contudo, a concentração adequada do antimicrobiano não é atingida nos tecidos do hospedeiro nem no ambiente intracelular o que promove a ineficiência da terapêutica (ROMANÍ et al., 2008; YANG et al., 2014).

Um fato importante a ser considerado sobre a atuação da matriz EPS na ineficiência de erradicação de biofilmes é que além de limitar a difusão de sanitizantes ela pode reagir com os mesmos e promover a inativação, pois já é conhecido que alguns sanitizantes químicos podem ter sua ação reduzida ou mesmo eliminada na presença de compostos orgânicos, como proteínas, polissacarídeos e lipídeos, a exemplo destaca-se o hipoclorito de sódio (NaClO) um sanitizante muito utilizado em indústrias de alimentos e em limpezas domésticas e hospitalares (OLIVEIRA; PICOLLI, 2010).

Outro fator a ser considerado é que as células presentes na parte interna de um biofilme enfrentam muitas vezes condições de escassez de oxigênio e de nutrientes, o que as faz entrar na fase estacionária de crescimento (ou fase de dormência) gerando assim o fenômeno chamado de tolerância. Com isso, estes micro-organismos se tornam menos susceptíveis à ação de agentes quimioterápicos que dependem da multiplicação microbiana, no caso das bactérias podemos citar os beta-lactâmicos (HØIBY et al., 2011). Neste sentido nota-se que existem duas subpopulações microbianas com fenótipos diferentes dentro de um biofilme, sendo uma metabolicamente ativa e outra inativa, uma vez que a primeira se encontra na área mais superficial em contato com o meio externo e se apresenta suscetível aos mecanismos de ação dos antibióticos, e a segunda encontra-se submersa na matriz EPS no

interior do biofilme com uma lenta taxa de divisão celular (SOTO, 2013).

O estudo desenvolvido por Mah (2012) mostrou que a resistência antimicrobiana dentro de um biofilme também pode ocorrer por mutação natural ou aquisição de genes de resistência (por conjugação, transformação ou transdução). Tais genes podem codificar a produção de novas porinas alterando os alvos dos antibióticos, a expressão de enzimas modificadoras de antibióticos. Um fenômeno que também pode ocorrer é a tolerância a antibióticos, a qual pode ser definida como a capacidade de sobrevivência das células mesmo durante exposição a agentes quimioterápicos, devido a um estado fenotípico reversível originado principalmente pela ação das bombas de efluxo (MAH, 2012).

O fenômeno conhecido como expressão de bombas de efluxo, que baseia-se principalmente na expulsão do antimicrobiano do meio intracelular para o extracelular também vem sendo associado ao aumento do perfil de resistência em células microbianas que se encontram em biofilmes, e este mecanismo pode ser observado em *C. albicans* (SARDI et al., 2014).

Esta espécie possui dois principais tipos de bombas de efluxo o primeiro é conhecido como ATP-binding cassette (ABC) (SHARMA, M.; PRASAD, 2011) e o segundo do tipo MDR (*multidrug resistant*) (ACKER; DIJCK; COENYE, 2014). Os genes que codificam tais bombas são regulados positivamente durante a formação e maturação do biofilme. Com isso, já foi verificado que no decorrer do desenvolvimento do biofilme de *C. albicans*, a tolerância ao fluconazol pode tornar-se rapidamente e é atribuída principalmente à expressão dos genes CDR1, CDR2 e MDR1 (MATEUS; CROW; AHEARN, 2004).

Devido à natureza heterogênea dos biofilmes, uma vez que são formados quase sempre por uma mistura de diferentes tipos de micro-organismos vivendo em comunidade, é provável que vários mecanismos de resistência desempenhem ação conjunta, proporcionando elevado nível geral de resistência. A resistência específica de um biofilme inclui a tolerância aos agentes antimicrobianos e significa que o mecanismo de resistência ocorre predominantemente em células sésseis e não somente em células planctônicas. No entanto, espera-se que os mecanismos individuais clássicos proporcionem resistência adicional ao biofilme, contribuindo para o nível global de resistência (MAH, 2012; RAMOS et al., 2018).

De acordo com todos os fatos a respeito da complexidade dos biofilmes e das dificuldades no tratamento e erradicação dos mesmos, a ciência moderna ainda continua na busca por novos agentes medicamentosos que possam atuar de forma e eficaz e segura,

proporcionando confiabilidade e segurança à terapêutica das infecções microbianas.

2.3. A biodiversidade como fonte de moléculas bioativas na prospecção de antimicrobianos.

Visto toda a sua grandiosidade e abrangência, a biodiversidade constitui-se de diversos nichos biológicos indiscutivelmente favoráveis para a manutenção e progressão da espécie humana. Um excelente exemplo desta afirmação, é a utilização de plantas medicinais na terapêutica de uma ampla gama de doenças que afetam a qualidade de vida de todos os seres humanos e animais (RAMOS et al. 2015).

Desde os primórdios da civilização o homem encontra na natureza alimentos e meios de sobrevivência e substâncias bioativas aplicáveis que visam promover a cura manutenção da espécie, reconhecendo o rico repertório de moléculas produzidas encontradas na natureza e classificando-as como uma fonte fértil de terapêutica. Até o início do século 19, as plantas medicinais eram consideradas como as fontes de moléculas com aplicabilidade terapêutica mais importantes e insubstituíveis, no entanto, com o desenvolvimento da química vegetal desde o século 18, culminando com o isolamento de morfina 1805 pelo boticário F.W.A. Sertürner, a atenção finalmente se voltou para substâncias individuais, seus derivados e moléculas sintéticas, que poderiam ser rapidamente produzido a nível industrial. No progresso deste desenvolvimento, muitas plantas medicinais com potencialidade terapêutica promissora caíram no esquecimento, e os estudos investigativos das propriedades terapêuticas das mesmas foram considerados como ultrapassados (KOPP, 2017).

Devido à expansão e aumento dos casos clínicos severos, particularmente associados às infecções microbianas, as plantas medicinais emergiram no século 20 portando-se como uma importante área do conhecimento científico que prometia oferecer uma vasta variedade de compostos bioativos com e com a vantagem de ser uma fonte renovável e sustentável (SHEN, 2015). Entretanto, o público está cada vez mais ciente de problemas relacionados com o uso excessivo de antibióticos, o que se relaciona com altos índices de efeitos colaterais e incidência do perfil de resistência de espécies microbianas aos fármacos disponíveis em prática clinica. Em vista disso, muitas pessoas são atraídas por ter mais autonomia em relação aos cuidados médicos, uma vez que a auto-medicação com substâncias vegetais é comum devido à fácil disponibilidade (SUBRAMANI; NARAYANASAMY; FEUSSNER, 2017).

Por se tratar de um resultado evolutivo relacionado com as interações destas biomoléculas no ambiente, a vasta variedade de produtos químicos presentes nos produtos naturais têm maior chance de serem biologicamente ativos do que compostos resultantes de síntese combinatória. Nos dias de hoje, o uso e manejo de produtos naturais com propriedades medicinais é um mercado cada vez maior e atualmente bilhões de pessoas em regiões em desenvolvimento do globo estão utilizando plantas medicinais e outros produtos naturais como meio de tratar doenças infecciosas (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Segunfo Effert e Koch, o número de compostos bioativos derivados de plantas foi estimado em pelo menos 200 mil e ainda representa apenas uma fração dos compostos produzidos pelas espécies de plantas que crescem na Terra. Na verdade, mais da metade dos medicamentos clínicos de 1981 a 2014 são derivados ou inspirados por produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2016) e são a base para estudos de novas combinações e modificações estruturais que permitam otimizar e/ou sintetizar novos fármacos (TASKER; HERGENROTHER, 2017).

As plantas são consideradas como ricas fontes de valiosos metabólitos secundários, como quinonas, taninos, terpenóides, alcalóides, flavonóides e polifenóis, os quais são utilizados pelas mesmas como mecanismo de defesa contra a predação por micro-organismos, insetos e herbívoros. Estes agentes químicos orgânicos despertam interesse na comunidade científica, uma vez que a possuem significativo padrão de espectro de ação, destacando-se as propriedades antimicrobiana, antioxidante, antiproliferativo de células tumorais além de serem amplamente empregados na indústria de cosméticos, ora como princípios ativos em formulações com aplicabilidade estética, ou até mesmo terapêutica de infecções superficiais (NEWMAN; CRAGG, 2012).

Estes compostos merecem destaque na área científica em relação ao potencial antimicrobiano. A direta interação com a membrana citoplasmática classifica-se como o sítio de ação mais comum dos metabólitos secundários. Diversos compostos oriundos das plantas medicinais, tais como flavonóides e polifenóis possuem a capacidade de desencadear o processo de lise celular microbiana ocasionando o extravasamento do conteúdo celular e consequentemente a morte, adicionalmente, estes compostos podem também atuar no processo de formação destas membranas gerando defeitos de formação na mesma (GYAWALI; IBRAHIM, 2014).

A interação com o material genético e síntese de proteínas também é uma fator

predisponente na promoção da ação terapêutica, neste caso, quando em contato com o material genético é capaz de promover alterações na codificação do DNA microbiano, resultado em ineficazes transcrições promovendo a desorganização de funções vitais para a célula (BUTLER, 2008).

Em termos simples, a diversidade química e estrutural dos derivados de plantas é imensa e o impacto do potencial antimicrobiano está diretamente relacionado com a configuração estrutural das moléculas, a exemplo destas afirmações destaca-se o processo de ação dos compostos fenólicos. Estes compostos são classificados como um dos mais interessantes metabolitos secundários no que se diz respeito ao potencial antimicrobiano, uma vez que uma ampla diversidade de moléculas são dotadas de grupamentos hidroxílicos (OH), os quais são os responsáveis pela atividade antimicrobiana desempenhada por muitas moléculas ativas contra fungos e bactérias patogênicas, atuando principalmente na promoção da lise na célula microbiana (GYAWALI; IBRAHIM, 2014; QADIR et al., 2017).

Uma vez que os metabolitos secundários são oriundos de plantas medicinais disponíveis na biodiversidade, não é de se estranhar que a composição química dos mesmos seja influenciada por fatores intrínsecos e extrínsecos que conferem variabilidade composicional, tais como, calor, humidade, luz, entre outros. Sendo assim, pesquisadores da área buscam uma maneira de padronizar os métodos investigativos para que gerar padronização dos dados obtidos (SIMÕES et al., 2017).

No decorrer dos estudos dos produtos naturais com propriedades antimicrobianas, alguns problemas referentes à reprodutibilidade dos resultados relacionados com os valores inibitórios em comparação com outras pesquisas são encontrados. Esta falta de consenso referente a escolha do melhor método investigativo adotado por pesquisadores de todo mundo deve ser sanada a fim de garantir a confiabilidade dos resultados a partir do emprego de abordagens investigativas modernas e eficazes.

O estudo realizado por Van Vuuren (2008), destacou este aspecto da necessidade de padronização entre pesquisadores em relação à metodologia e às necessidades técnicas. Nesta revisão, os autores recomendam o desuso de algumas técnicas investigativas, tal como a difusão em disco como um meio para determinar a atividade antimicrobiana de plantas medicinais. Atualmente em seu novo estudo recentemente publicado (VUUREN, VAN; HOLL, 2017) os autores mencionam que literatura recente mostrou a difusão em disco não é mais uma técnica comumente utilizada e, quando usado, geralmente é acompanhado pelo

método de microdiluição o qual se classifica como uma das principais abordagens investigativas na determinação da concentração inibitória mínima (CIM) necessária para promover a inibição do crescimento microbiano.

Nos últimos anos, nota-se que microdiluição permaneceu como o principal método de escolha para a determinação do potencial antimicrobiano de produtos naturais, e um dos principais motivos se faz na possibilidade de usar menos material vegetal no decorrer do processo investigativo, possibilitando a avalição do potencial antimicrobiano sobre outras espécies de micro-organismos. Adicionalmente, nota-se o crescente uso de outras técnicas para verificar o potencial antimicrobiano d derivados vegetais, tais como o uso da bio-autografia, influencia no processo de *quórum sensing* por técnicas moleculares, determinação do tempo de morte (*Time kill*) e principalmente a determinação da atividade sobre biofilmes, a qual mostra-se como uma das mais crescentes (DING et al., 2017; VUUREN, VAN; HOLL, 2017).

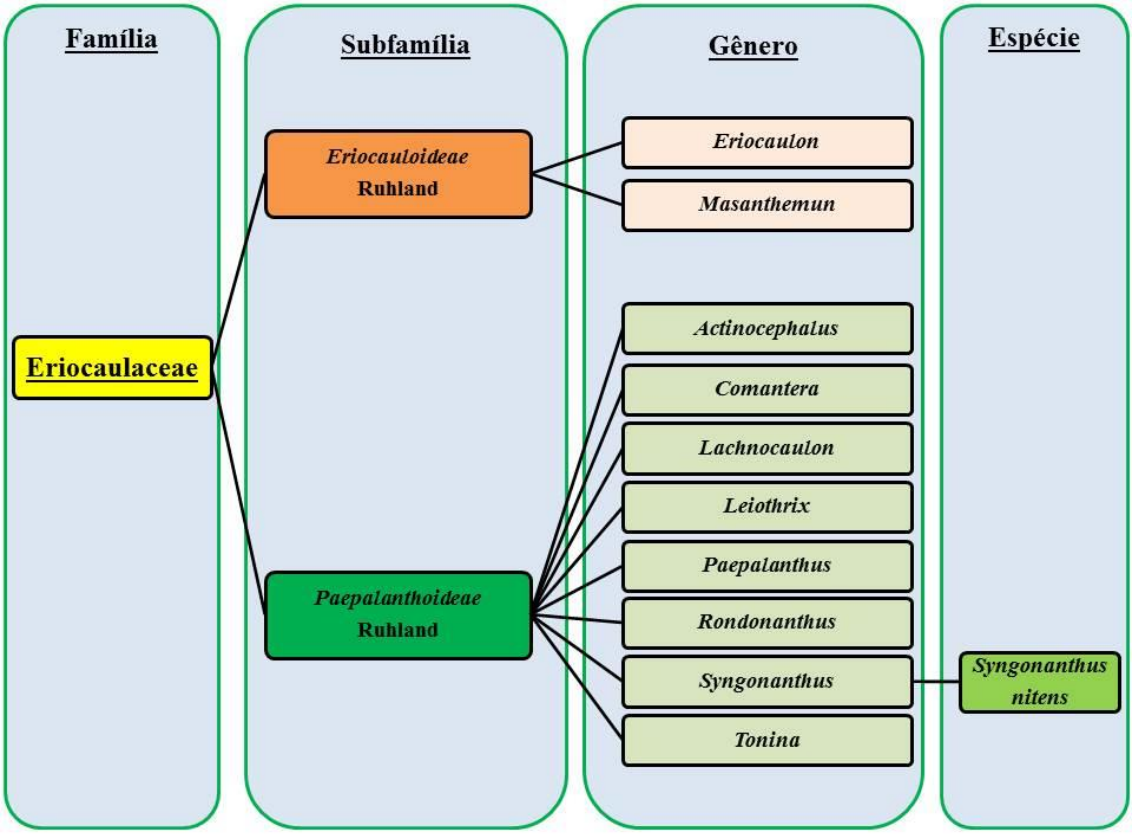
2.3.1. A família botânica Eriocaulaceae

Classificada como a família botânica composta predominantemente pelas conhecidas "sempre vivas", a família Eriocaulaceae destaca-se como uma das famílias mais representativas dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço - MG e da Serra do Jalapão no Estado do Tocantins, e isto se deve não só pela grande riqueza específica, mas também pelo elevado número de táxons endêmicos desta formação geológica. As plantas pertencentes a esta família possuem inflorescências do tipo capítulos, que são envolvidos por brácteas, e folhas em forma de roseta, de onde brotam os escapos, e destes, surgem os capítulos (ANDRADE et al., 2010; PACIFICO et al., 2011).

A família se divide em duas subfamílias: *Eriocauloidae* (composta por 2 gêneros), e a *Paepalanthoideae*, (composta por 8 gêneros). Dos 8 gêneros pertencentes a esta família originam-se mais de 1200 espécies, as quais estão distribuídas em regiões pantopricais do globo (ANDRADE et al., 2010; GIULIETTI et al., 2012).

A Figura 4 esquematiza a subdivisão desta família, destacando as subfamílias, gênero e a espécie *Syngonanthus nitens*, a qual é a espécie de interesse neste estudo.

Figura 4. Esquematização simplificada da divisão da família botânica Eriocaulaceae



Fonte: Baseado em Giulietti et al. (2012) e adaptado de Zanutto (2013).

No Brasil, observa-se a presença espécies dos gêneros *Eriocaulon, Paepalanthus, Syngonanthus, Leiothrix, Tonina, Comanthera e Actinocephalus*, ou seja, dos 10 gêneros presentes na família, 7 são de ocorrência brasileira, sendo alguns deles endêmicos a uma determinada região do território nacional (ANDRADE et al., 2010; TERUYA et al., 2011)

O nome "Sempre viva" é oriundo de uma característica peculiar dos integrantes desta família, sendo esta a habilidade de manter-se íntegras após longos períodos, mesmo após a retirada do solo. Em virtude disso, muitas espécies desta família são consideradas como matéria-prima para confecção de acessórios e ornamentos decorativos (RAMOS, 2015).

A fabricação destes objetos tornou-se uma das principais fontes de renda para diversas famílias habitantes a Cadeia do Espinhaço (Minas Gerais e Bahia) e da Serra do Jalapão (Tocantins), e esta prática é certamente decorrente do declínio da atividade mineradora nestas áreas que conheceram grandes riquezas durante os ciclos do ouro e do diamante. A coleta dessas plantas para exportação é responsável pelo sustento de inúmeras famílias da região,

entretanto esta prática comporta-se como predatória, desconhecendo completamente os riscos de extinção das mesmas. (GIULIETTI et al., 1988; ANDRADE et al., 2010).

A maioria das espécies que são comercializadas como "sempre vivas" para a confecção destes ornamentos pertencem ao gênero *Syngonanthus.* Este gênero possui aproximadamente 200 espécies, com distribuição nas Américas, principalmente a do Sul, e na África. No Brasil, a maior parte é encontrada nos Estados de Minas Gerais e Bahia, onde já foram encontradas cerca de 180 espécies (PACIFICO et al., 2011).

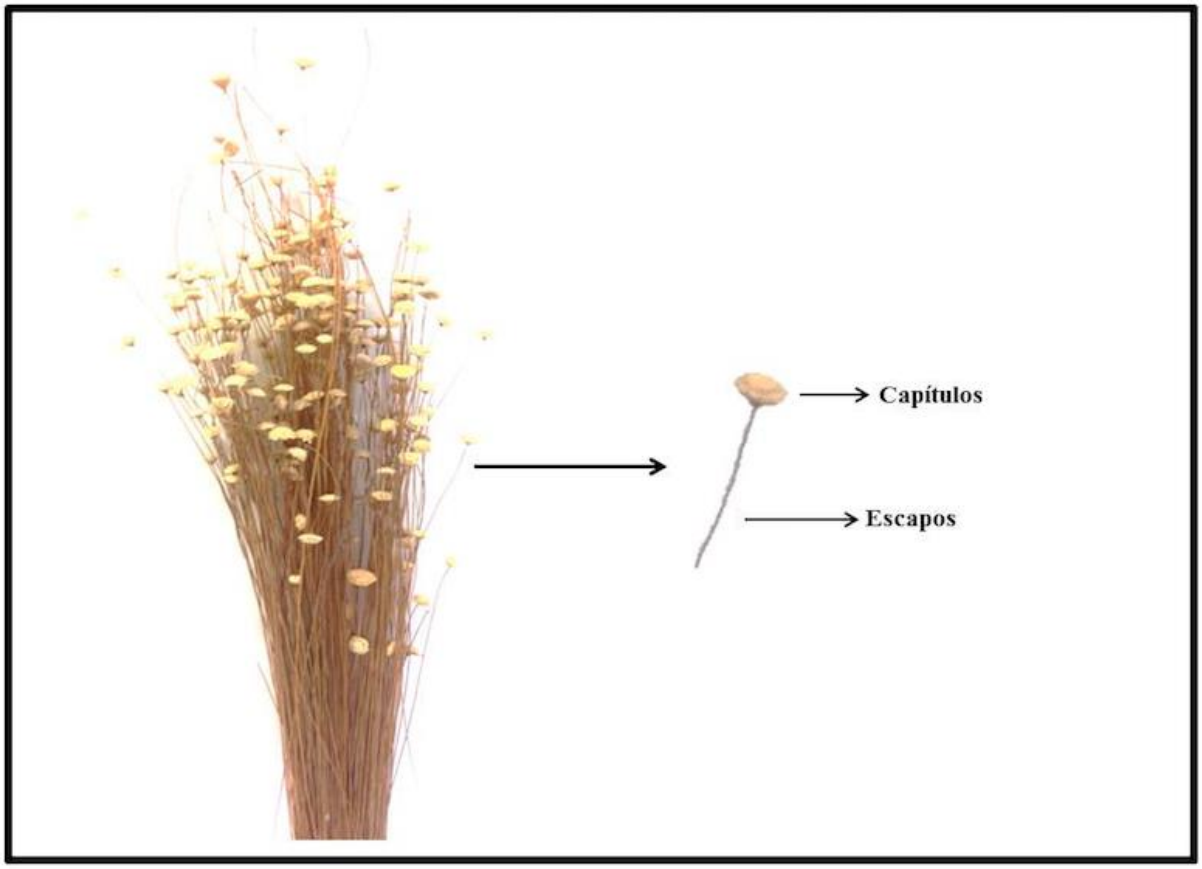
A atividade biológica destas plantas iniciou-se com a descoberta do metabólito paepalantina, classificada como uma naftopiranona, que rotineiramente não é encontrado em plantas mas sim em micro-organismos fúngicos como aqueles do gênero *Penicillium* spp. Desde então, alguns estudos referentes a atividade biológica de extratos vegetais e substâncias isoladas foram realizados (ZANUTTO, 2013; OLIVEIRA et al., 2013; RAMOS et al., 2015; RAMOS, et al., 2016).

2.3.1.1. A espécie *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland

Visto à indiscutível coloração característica de ouro atribuída a esta espécie, a *Syngonanthus nitens* é conhecida popularmente como "Capim dourado", sendo assim, trata-se da espécie mais empregada na confecção de ornamentos e acessórios, uma vez que apresentam longos escapos inflorescentes nesta coloração (SAMPAIO et al., 2011).

A Figura 5 apresenta esta espécie (planta vegetal) onde é possível verificar os capítulos e principalmente a característica dourada dos escapos.

Figura 5. *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland – Planta vegetal



Fonte: O autor

Inicialmente, as peças artesanais eram manufaturadas por índios da etnia Xerente (Tocantins). Os artefatos produzidos por eles eram usados em casa ou trocadas por outros produtos a fim de manter seu consumo próprio. Por volta de 1930, a arte de tecer o capim dourado foi aprendida por famílias do povoado da Mumbuca, na região do Jalapão. Visto a beleza dos produtos obtidos com o emprego do capim dourado como matéria prima, sua comercialização ganhou forca e desde o final da década de 90 são vendidas em todo o Brasil e no mundo a fora, principalmente em países como os Estados Unidos e Alemanha (FICHINO et al., 2012; SAMPAIO et al., 2011) A Figura 6 apresenta alguns dos artesanatos produzidos com o escapos desta planta.

Figura 6. Artesanato obtido através do "capim dourado"como matéria-prima



Fonte: Sampaio et al., 2011

Esta espécie ganha destaque nos estudos realizados com Eriocauláceas visto aos excelentes resultados referentes ao perfil químico e potencial biológico. Os primeiros estudos químicos com esta espécie foram iniciados em 2011 durante o projeto de mestrado de Mariana Pacífico (PACÍFICO, 2011) onde foram identificaram 17 compostos, entre flavonas e xantonas, incluindo 6 novas moléculas, em extratos de *S. nitens*, o que colaborou para a ampliação de estudos biológicos da espécie uma vez que a elucidação da presença de fenóis, flavonoides e xantonas nesta planta foi um indicativo inicial de um promissor perfil antimicrobiano (PACIFICO et al., 2011). Paralelamente a estes dados, em um estudo quantitativo realizado em 2012 foi encontrado o flavonóide luteolina no extrato metanólico dos capítulos e escapos de *S. nitens* e a 3,6-dimetoxi-1,5,7-trihidroxixantona presente apenas no extrato metanólico dos capítulos. A presença desta substância de promissor potencial antimicrobiano serviu de base para uma investigação acerca do referido potencial fosse iniciada (ANDREA et al., 2012).

Em 2013 foi verificado que xantonas isoladas do extrato metanólico de *S. nitens* podem ser úteis como fitoestrógenos, fornecendo uma nova oportunidade para desenvolver agentes hormonais, além disto, a presença de flavonas e xantonas, também poderiam ser utilizadas como um novo agente antimutagênico, visto que apresentou resultados satisfatórios na investigação (OLIVEIRA et al., 2013).

Em vista destes excelentes resultados, o estudo com esta espécie foi continuado durante o projeto de Mestrado do autor, onde importantes resultados referentes ao potencial

antifúngico desta espécie foram elucidados contra diferentes linhagens de *Candida* spp (RAMOS, 2015). No ano de 2015 publicamos um artigo de pesquisa elucidando o potencial antifúngico do extrato metanólico de escapos desta espécie contra cepas de *Candida krusei*, um importante patógeno fúngico que possui resistência intrínseca ao fluconazol. Neste estudo utilizamos o extrato vegetal bruto não incorporado e incorporado em um sistema de liberação de fármacos baseado em nanotecnologia o qual resultou em importantes resultados referentes ao potencial inibitório e profilático no desenvolvimento da CVV causada por esta espécie microbiana (RAMOS et al., 2015).

Em continuidade a este estudo, e baseando-se no potencial deste extrato contra linhagens de *Candida* spp., desenvolvemos um estudo voltado ao tratamento da CVV causada por *C. albicans*, qual resultou em uma publicação relatando a aplicabilidade deste derivado vegetal no tratamento desta doença quando o mesmo foi utilizado de forma livre e incorporada em um sistema nanotecnológico de liberação de fármacos. Além disso, foi verificado que extrato foi capaz de inibir a formação e o desenvolvimento de hifas na concentração de 250 µg/mL no período de 24 horas, além do potencial anti-biofilme (RAMOS et al., 2016).

Em vista de todos os resultados relacionados com o potencial antifúngico desta espécie vegetal, em especial à promissora atividade contra espécies de *Candida*, nos propomos a aprofundar os estudos com este extrato voltando-se a um maior entendimento e novas abordagens para o tratamento da CVV. Adicionalmente, baseamo-nos em quatros subáreas da ciência para compor a atual Tese de Doutorado, sendo elas a Microbiologia, Farmacognosia, Ginecologia e Nanotecnologia farmacêutica. A junção de conhecimentos destas importantes áreas da saúde com a aplicabilidade de *S. nitens* na terapêutica da CVV fundiram a objetividade e contextualização deste estudo.

2.4. Nanotecnologia farmacêutica

A nanotecnologia está relacionada à caracterização, produção e aplicações de estruturas, dispositivos e sistemas, controlando-se a forma e o tamanho em escala nanométrica. Esta ciência baseia-se na criação e uso de materiais e dispositivos ao nível de moléculas e átomos, voltando-se ao design, síntese, criação, manipulação e aplicação de materiais em escala manométrica. Está se tornando cada vez mais importante em campos

como agricultura, engenharia, construção, microeletrônica e cuidados de saúde, etc. Em especial, os olhos da ciência têm-se voltado à aplicação da nanotecnologia no campo da atenção à saúde a fim de promover a otimização de diagnósticos e terapias. O uso de materiais estruturados em nanoescala são os principais integrantes da nanomedicina, ciência esta que mantém-se em constante evolução, e gera impactos satisfatórios na economia mundial das indústrias farmacêuticas (HASSAN et al., 2016).

De maneira geral, todos os setores das Ciências da Saúde baseiam-se no uso de agentes farmacologicamente ativos (uso profilático e/ou terapêutico) para fornecer bases seguras para o gerenciamento ou reversão do curso de diversos tipos de doenças. Notavelmente, é comum observar que diversos agentes farmacologicamente ativos em ensaios biológicos *in vitro* não desempenham seu perfil farmacológico de maneira efetiva no organismo, e esta razão é atribuída por diversos fatores, tais como a via de administração, interações medicamentosas, predisposição genética, entre outros (TIBBITT; DAHLMAN; LANGER, 2016).

Um dos grandes problemas relacionados com a perda de atividade farmacológica de princípios ativos se faz na insolubilidade dos mesmos e principalmente na via de administração a qual o fármaco é pretendido. Além disso, fatores relacionados com a farmacocinética, absorção, distribuição, metabolismo, duração do efeito terapêutico, excreção e a toxicidade são os principais problemas encontrados pelos pesquisadores farmacêuticos a medida que novas moléculas terapêuticas são descobertas, o que gera a necessidade de se complementar e otimizar a veiculação, a fim de proteger os princípios ativos de fatores como a degradação precoce e inativação dos mesmos visto, que estes fatores afetam diretamente a segurança e eficácia dos medicamentos inviabilizando a terapia (BONIFÁCIO et al., 2013).

A nanotecnologia farmacêutica é classificada como uma importante ferramenta presente nas inúmeras aplicabilidades de se trabalhar com compostos em ordem de nanômetros. As Ciências Farmacêuticas conta com o emprego desta ferramenta no descobrimento e otimização do potencial biológico de compostos ativos, amparando-se em promissores sistemas de liberação de fármacos que promovem indiscutíveis benefícios aos compostos bioativos e como consequência, geram maior desempenho dos mesmos (PELGRIFT; FRIEDMAN, 2013).

As vantagens oriundas do uso de da nanotecnologia farmacêutica são inúmeras, entretanto, o principal foco dessa ciência relaciona-se com características exercidas pelas

nanopartículas que compõe os mais diversos sistemas nanotecnológico de liberação de fármacos (SILVA et al., 2014).

As nanopartículas possuem as características necessárias para que esses sistemas de liberação de fármacos controlados sejam efetivos, uma vez que existe certa liberdade na escolha dos constituintes, o que permite que os princípios ativos sejam entregues em local apropriado, mantendo-se a concentração dos mesmos em níveis adequados por longos períodos, além de promover a prevenção da degradação. Estas nanoestruturas permitem ainda maior eficiência de encapsulação e liberação controlada se comparadas aos sistemas de encapsulação convencionais, além de possuírem tamanho pequeno suficiente para serem injetadas diretamente no sistema circulatório e oferecerem a possibilidade de administração por outras vias como pulmonar, nasal, transcutânea e oral (PINTO REIS et al., 2006; RIZZELLO; CINGOLANI; POMPA, 2013).

Dentre os tipos de nanoestruturas utilizadas pela indústria farmacêutica para a encapsulação de ativos destacam-se os lipossomas, nanopartículas poliméricas, ciclodextrinas e nanopartículas lipídicas. Adicionalmente, sistemas nanoestruturados como micro e nanoemulsão, cristais líquidos mucoadesivos, entre outros, são excelentes opções para incorporação fármacos insolúveis ou com baixo padrão de seletividade. Listam-se ainda nanopartículas as quais os ativos podem estar associados: do tipo metálica, fulerenos, dendrímetros ou nanotubos de carbono (BLECHER; NASIR; FRIEDMAN, 2011; SILVA et al., 2014).

No cenário das doenças infecciosas, o uso de nanopartículas comporta-se como um grande aliado no combate a diversos tipos de infecções, e classifica-se hoje como uma das principais opções de veiculação de princípios ativos antimicrobianos. O emprego destas estruturas pode direcionar os agentes terapêuticos para o local da infecção, de modo que doses mais adequadas de fármaco sejam administradas no local infectado, superando os mecanismos de resistência existentes, e com menos efeitos adversos sobre o paciente (LEID et al., 2012).

As nanopartículas podem ser direcionadas para locais de infecção passivamente ou ativamente. De forma passiva, as nanopartículas sofrem extravasamento seletivo nos locais da infecção, onde a inflamação levou ao aumento da permeabilidade do vaso sanguíneo. Já de forma ativa, contém agentes ligantes (por exemplo, anticorpos) que se ligam aos receptores (por exemplo, antígenos) nos locais de infecção e liberam o princípio ativo (PELGRIFT; FRIEDMAN, 2013).

A ação também pode ser ativada por certos estímulos, tais como espécies reativas de oxigênio ou baixo pH no local da infecção. A liberação de medicamentos também pode ser regulada por orientação magnética ou radiofrequência, a fim de direcionar a liberação de drogas para o local de infecção (BLECHER; NASIR; FRIEDMAN, 2011).

O papel da nanotecnologia no aprimoramento de agentes antimicrobianos vai muito além do direcionamento dos ativos no local da infecção. Um bom exemplo desta afirmação é utilização desta ferramenta para a encapsulação do antifúngico anfotericina B. Visto ao alto perfil nefrotóxico atribuído a este medicamento, a indústria farmacêutica foi apoiada por cientistas no desenvolvimento de novas versões reformuladas do agente para garantir o uso deste fármaco como antifúngico e promover a diminuição do efeito tóxico. Como resultado, as versões mais bem sucedidas, clinicamente comprovadas, baseiam-se em formulações farmacêuticas sintetizadas a partir de combinações de lipídeos, encapsuladas em lipossomas ou em complexos lipídicos, os quais encontram-se disponíveis na terapêutica nos dias atuais (AVERSA et al., 2017).

O emprego desta ferramenta em medicina vai muito além da criação de sistemas de liberação de fármacos inovadores. Além de promover a liberação de princípios bioativos, nanopartículas são utilizadas como fontes de calor, luz ou outras substâncias estrategicamente sintetizadas a fim de atingir alvos específicos, tais como o caso de células cancerosas. A versatilidade desta ferramenta possibilita que partículas em ordem nano sejam projetadas para atrair células doentes, o que permite o tratamento direto das mesmas, mantendo as células saudáveis em segurança (HASAN et al., 2016).

A estratégia de aplicação da nanotecnologia utilizando extratos vegetais, vem sendo relatada na literatura uma vez que os sistemas nanoestruturados demonstram ser capazes de potencializar a ação de extratos de plantas, reduzindo a dose necessária e os efeitos colaterais, e consequentemente melhorando sua atividade biológica (BHARALI et al., 2011; GHOSH et al., 2013; RAJENDRAN et al., 2013).

Nosso grupo de pesquisa publicou uma revisão bibliográfica (BONIFÁCIO et al., 2014) enfatizando a utilização de sistemas de liberação de fármacos para a incorporação de produtos de origem natural com a finalidade de promover o aumento da biodisponibilidade dos mesmos. Foram apresentados sistemas de liberação de fármacos de grande importância e muito utilizados na terapêutica moderna, sendo eles: nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas sólidas, sistemas líquidos cristalinos, lipossomas e microemulsão. As

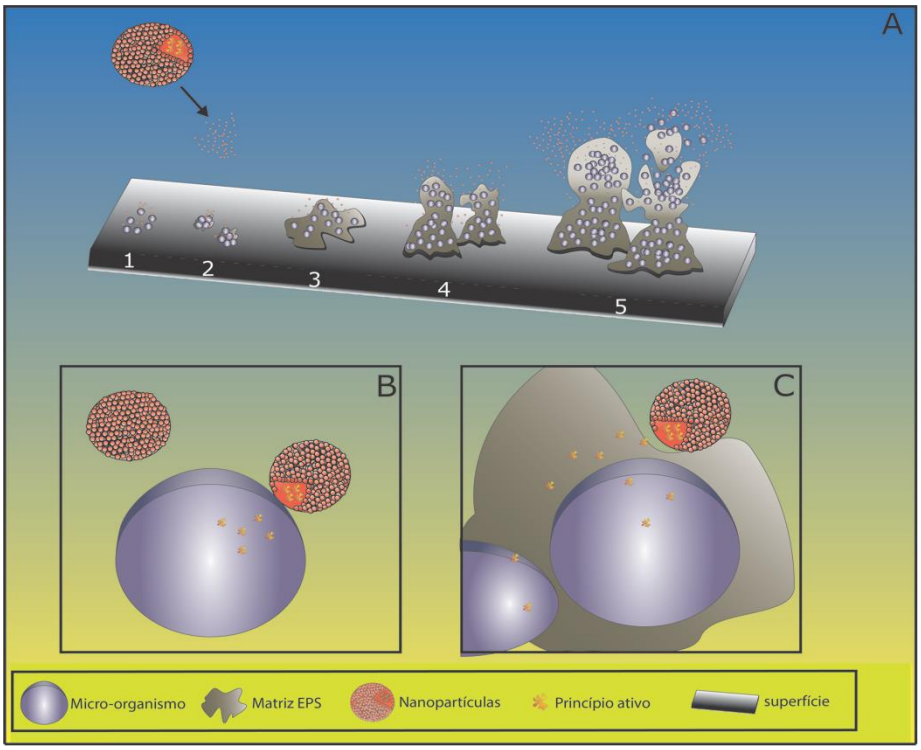
pesquisas apresentadas pelos autores demonstraram que a veiculação em bases nanotecnológicas promoveu uma melhor ação farmacológica em todos os casos analisados.

Voltando-se ao tratamento de doenças infecciosas, recentemente publicamos outro artigo de revisão bibliográfica, na qual foi apresentada a aplicabilidade de sistemas de liberação de fármacos voltados ao tratamento e controle de biofilmes bacterianos e fúngicos. Os resultados das pesquisas apresentadas nesta revisão mostram a grandiosidade em utilizar-se estes tipos de sistemas de liberação no tratamento de infecções microbianas, em especial, doenças infecciosas crônicas causadas pela presença de biofilmes. Resultados relacionados com o aprimoramento da atividade de princípios ativos e seletividade microbiana foram apresentados (RAMOS et al., 2018).

A aplicabilidade destes sistemas durante o tratamento de biofilmes é variável, no entanto, os sistemas de administração de fármacos baseados na nanotecnologia podem promover a interação direta com a estrutura complexa dos biofilmes e exercer ação nos diferentes estágios da formação do biofilme. Entre as principais habilidades desses sistemas, duas são predominantemente estudadas pelos pesquisadores, sendo elas: a interação direta com células planctônicas (células únicas) e a interação ou desnaturação da matriz polimérica (RIZZELLO; CINGOLANI; POMPA, 2013).

A Figura 7 esquematiza a interação de um sistema de entrega de drogas que contém nanopartículas para liberação de fármaco e sua interação nos estágios de formação de biofilmes

Figura 7. Principais estratégias de ação de nanopartículas desenvolvidas para atuarem sobre biofilmes microbianos



Fonte: Adaptado de Ramos et al. (2018)

A interação direta de nanopartículas com células individuais (Figura 2B) que estão envolvidas no evento inicial do processo de formação de biofilmes (adesão primária) pode impedir o processo contínuo de formação, já que a interação direta entre nanopartículas e membranas dos micro-organismos (por exemplo, nanopartículas lipídicas, lipossomas, nanoemulsões lipídicas, e outros) facilita a entrada do medicamento no meio intracelular. Esse tipo de interação também pode ser atribuído durante o evento final (dispersão), onde as células individuais são separadas da matriz polimérica, tornando-os capazes de reiniciar o ciclo de formação (RAMOS et al., 2018).

A interação de sistemas lipídicos nanoestruturados, como lipossomas, nanoemulsões, nanopartículas lipídicas sólidas, lipoproteínas e micelas, e outros, também podem exercer ação direta com a matriz polimérica do biofilme (Figura 2C), promovendo a fusão das nanopartículas e causando a desnaturação das proteínas e a fusão das bicamadas lipídicas, facilitando a entrada das nanopartículas dentro do biofilme para promover o contato com as células microbianas.

2.4.1. Sistemas lipídicos nanoestruturados

O evento de fornecimento adequado dos princípios ativos no sítio de ação desejado é um grande problema no tratamento de muitas doenças, uma vez que muitos fármacos ativos sofrem processos de desestabilização prévia que impossibilita a chegada de concentrações adequadas dos bioativos no alvo pretendido (SINGH et al., 2011).

Este fenômeno muitas vezes é caracterizado por fatores como eficácia limitada, baixa biodistribuição e falta de seletividade. Como apresentado no item 2.4., a nanotecnologia farmacêutica comporta-se como uma grande aliada na solução destes problemas, fornecendo sistemas de liberação de fármacos que prometem aprimorar o desempenho de fármacos controlando o fornecimento dos mesmos e aumentando os parâmetros referentes à biodisponibilidade e bioequivalência, e diminuição dos efeitos tóxicos dos mesmos (WILCZEWSKA et al., 2012).

Os sistemas lipídicos nanoestruturados (SLN) classificam-se como uma estratégia louvável para a administração de fármacos. Dentro desta classe destacam-se os lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas, micro e nanoemulsões, os quais prometem veicular fármacos de maneira eficaz gerando maior especificidade de ação (BONIFÁCIO et al., 2014).

A presença de micelas compostas por lipídeos organizados e estruturados em ordem de nanômetros conferem uma maior interação com as membranas lipídicas no sítio de ação pretendido. Esta propriedade confere a estes tipos de sistemas uma característica biológica atraente para criar-se interações diretas e mais especificas com determinados tipos de células, tais como o uso no tratamento e diagnóstico do câncer (LIN et al., 2015) e ação contra micro-organismos patogênicos (CATUOGNO; JONES, 2003; RAMOS et al., 2017).

Nosso grupo de pesquisa tem te empenhado no desenvolvimento e estudos deste tipo de sistema de liberação de fármacos. Em 2015 foi verificado que uma microemulsão lipídica desenvolvida para a incorporação do extrato bruto de *Astronium urundeuva* foi capaz de aprimorar a ação antifúngica contra *c. albicans* e apresentou significante perfil terapêutico da mesma em modelo experimental *in vivo* de CVV. No mesmo ano, um sistema de composição semelhante mostrou-se promissor na administração oral do mesmo extrato para o controle de infecção gástrica causada por *Helicobacter pylori* em roedores (NEGRI, 2015).

2.4.1.1. As nanoemulsões

As nanoemulsões (NE) caracterizam-se como um dos sistemas lipídicos nanoestruturados mais utilizados para veiculação de princípios ativos por via tópica e sistêmica. Possuem propriedades únicas, como pequeno tamanho de gotícula, estabilidade excepcional, aparência transparente e reologia ajustável, estas propriedades as tornam um sistema de liberação de fármacos atraentes para aplicações nas indústrias farmacêuticas, alimentos, cosméticos (GUPTA et al., 2016).

São classificadas como uma mistura heterogênea de dois líquidos imiscíveis (óleo em água ou água em óleo) possuindo tamanho médio de gotículas variando de 50 a 200 nm. As partículas presentes neste tipo de sistemas também podem ser chamadas de nanomicelas ou nanopartículas micelares, as quais são estabilizadas após a adição de surfactantes (tensoativos), um constituinte indispensável para que a conformação e heterogeneidade deste tipo de sistema se estabeleça (SARKER, 2005; THAKUR et al., 2012).

O emprego de agentes tensoativos é a peça chave para que as emulsões em geral sejam formadas e estabilizadas. Estes agentes são moléculas de superfície anfifílicas que podem reduzir a tensão interfacial entre duas fases líquidas imiscíveis de óleo e água, adsorvendo preferencialmente nas suas interfaces. Os agentes emulsionantes são compostos por duas extremidades, sendo um grupamento de cabeça polar que se orienta preferencialmente para o líquido polar, como a água por exemplo, e uma cauda hidrocarbonada não polar que prefere residir em líquido não polar como o óleo. Visualmente, possuem aparência transparente ou translúcida, e têm uma grande área superficial devido ao seu pequeno tamanho de partícula (MAHATO, 2017).

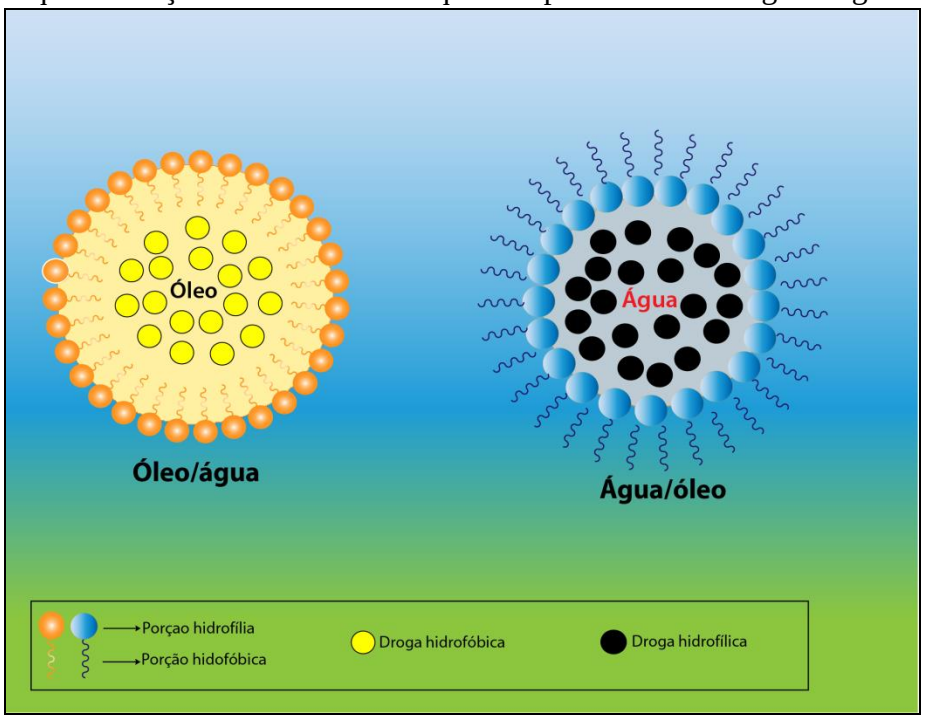
Estes sistemas espontaneamente formados possuem propriedades físico-químicas específicas como transparência e estabilidade termodinâmica, fatores que os tornam atrativos do ponto de vista da produção farmacêutica (SILVA et al., 2014).

Um dos grandes benefícios atribuído às NE se faz no fato que ao encapsular a droga no núcleo (hidrofílico ou hidrofóbico), promove-se a proteção do fármaco contra a degradação e hidrólise enzimática e evita o reconhecimento por macrófagos o que impossibilita a fagocitose, aumentando assim o tempo de circulação. A circulação mais longa permite que as nanoemulsões se acumulem em maior medida nas áreas com vasculatura defeituosa e com vazamento, por meio do efeito de permeabilidade e retenção. Este fenômeno

caracteriza o perfil versatilidade de administração dos fármacos nas mais diferentes vias de administração, tais como endovenosa, tópica, intramuscular e vaginal (MAHATO, 2017).

A Figura 8 esquematiza as nanomicelas presentes nos dois tipos de nanoemulsões que podem ser gerados a partir da mistura de água e óleo em presença de um agente tensoativo. A conformação destes constituintes originam as nanoemulsões água em óleo (A/O) e óleo em água (O/A).

Figura 8. Esquematização das nanomicelas que compõe as NE óleo/água e água/óleo



Fonte: Adaptado de Ramos et al. (2018).

Como apresentado na Figura 8, a conformação das nanomicelas resultantes da interação dos três constituintes que irão compor o sistema nanomulsionado, estabelece localização onde as drogas serão incorporadas e acomodadas de acordo com o seu grau de afinidade. A capacidade de veiculação de drogas polares e apolares faz deste sistema uma excelente escolha para a veiculação de substancias que apresentam dificuldades de solubilização em água, como os derivados vegetais por exemplo (BONIFÁCIO et al., 2014).

Durante muitos anos a literatura não apresentava um consenso entre a terminologia que poderia distinguir entre microemulsões (ME) e NE. Este fato transmitiu durante muito

tempo e errônea ideia de que se tratavam dos mesmos tipos de sistemas de liberação de fármacos, e isso se deve principalmente a todos os padrões de síntese e constituição de ambos os sistemas.

O termo "micro" geralmente significa 10^{-6}, enquanto o termo "nano-" significa 10^{-9}, o que, de fato, presume-se que as NE são constituídas de partículas menores do que aquelas contidas nas ME, todavia, a situação contrária é vista na prática, uma vez que, geralmente, o tamanho das partículas em uma ME é menor do que aquelas em uma NE (SARKER, 2005; MCCLEMENTS, 2012).

Outro fato se origina na obtenção destes dois tipos de sistemas, uma requerem tipicamente ingredientes bastante semelhantes, os quais se consistem em uma fase oleosa, uma fase aquosa, um agente tensoativo e, possivelmente, um co-tensoativo. De fato, é possível preparar ambos os tipos empregando exatamente os mesmos ingredientes em diferentes proporções. Entretanto, é necessária uma proporção maior de tensoativos para preparar uma ME do que uma NE. Outro fato importante se faz na forma de preparo destes dois sistemas, uma vez que as NE necessitam de carga no processo de formação (sonicador), já as ME não (BONIFÁCIO et al., 2015; NASTITI et al., 2017).

Em 2012, McClements publicou um artigo onde uma definição mais concreta destes dois tipos de sistema. O autor conclui que as ME é definida como uma dispersão coloidal termodinamicamente estável constituída de pequenas partículas esferóides (sintetizadas por óleo, surfactante e, possivelmente, co-surfactante) dispersas dentro de um meio aquoso. Já as NE são definidas como uma dispersão coloidal termodinamicamente instável consistindo em dois líquidos não miscíveis, sendo um dos líquidos dispersos sob a forma de pequenas gotículas esféricas (raio <100 nm) no outro líquido. Estas considerações são as bases para um melhor entendimento das diferenças entre os dois sistemas. Adicionalmente, as ME possuem um maior grau de transparência que as NE.

Em vista destes benefícios, e voltando-se a aplicabilidade das NE na administração de fármacos por via intravaginal (SILVA et al., 2014), este tipo de sistema comporta-se como uma ferramenta válida para a incorporação de derivados vegetais para o tratamento de infecções no trato genital feminino, o que nos incentivou a optar por este tipo de sistema para a veiculação de derivados do *S. nitens* voltando-se ao combate de leveduras do gênero *Candida* e a aplicação dos mesmos no tratamento da CVV.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Este estudo visou a potencialidade antifúngica de frações do extrato metanólico de escapos de *Syngonanthus nitens* não incorporado e incorporado em sistema lipídico nanoestruturado de liberação de fármacos frente a cepas de *Candida albicans* e verificar sua aplicação no tratamento da CVV.

3.2. Objetivos específicos

- Obter o extrato metanólico dos escapos de *S. nitens*;
- Fracionar o extrato metanólico de escapos de *S. nitens*;
- Avaliar a composição química das frações obtidas;
- Desenvolver um novo sistema lipídico nanotecnológico de liberação de fármacos (Nanoemulsão);
- Caracterizar o sistema de liberação de fármacos desenvolvido;
- Determinar a potencialidade antifúngica *in vitro* das frações de *S. nitens* não incorporadas e incorporadas na NE sobre cepas clinicas e padrão (ATCC) de *C. albicans*;
- Selecionar a fração mais ativa voltando-se à aplicação no tratamento da CVV;
- Avaliar o potencial antibacteriano da fração mais promissora sobre as linhagens de bacterianas *Lactobacillus acidophilus* e *Gardnerella vaginallis*;
- Determinar a potencialidade antifúngica *in vitro* das frações de *S. nitens* não incorporadas e incorporadas na NE sobre cepas clinicas e padrão (ATCC) de *Candida* não-*albicans*;
- Avaliar o mecanismo de ação dos derivados de *S. nitens* livres e incorporados nos sistemas desenvolvidos pelos ensaios de interação ergosterol / sorbitol;
- Avaliar *in vitro* a potencialidade da fração mais promissora (não incorporada e incorporada na NE) na inibição de biofilmes monotípicos (*Candida albicans*) e hetrotípicos (*Candida albicans* + *Lactobacillus acidophilus* e *C. albicans* + *G. vaginallis*);
- Determinar a citotoxicidade das frações não incorporadas e incorporadas sobre linhagens celulares VERO, HeLa e HaCat;

- Avaliar a interferência da fração de derivados de *S. nitens* não incorporada e incorporada na ME sobre a adesão de *C. albicans* pela técnica de *"Flow Chamber*";
- Determinar o envolvimento (análise transcriptômica) de genes relacionados com a adesão, resistência antifúngica e síntese de ergosterol em biofilmes monotípicos (*C. albicans*) e heterotípicos (*C. albicans* + bactérias vaginais) tratados e não tratados com os drivados de *S. nitens* incorporados ou não na NE desenvolvida;
- Avaliar o perfil citotóxico *in vivo* do extrato e da fração mais ativa de *S. nitens* (incorporados ou não na NE) no modelo experimental de *Artemia salina*;
- Avaliar a potencialidade terapêutica da fração mais promissora de *S. nitens* em modelo experimental *in vivo* de CVV em roedores da linhagem *Wistar*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção e procedência do material vegetal de *S. nitens*

Todo processo de obtenção, secagem e moagem da planta foi realizado no Laboratório de Fitoquímica situado no Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química de Araraquara-IQ/UNESP, sob supervisão e orientação da Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos.

As partes aéreas de *S. nitens* foram coletadas na Serra do Jalapão no Estado de Tocantins e identificadas pelo Prof. Dr. Paulo Takeo Sano do IB-USP – SP e uma exsicata encontra-se depositada no Herbário do IB – USP sob número SPF 189975. O material vegetal foi coletado e preparado conforme descrito por Pacífico et al. (2011).

Inicialmente, os capítulos foram retirados de modo que prevalecessem somente os escapos da planta. Em seguida, o material vegetal foi seco dispostos em camadas finas, submetidos à secagem em estufa de ar circulante a 45ºC durante 7 dias. Após este período o mesmo foi moído em moinho de facas.

A utilização desta planta foi regularizada junto ao Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado-SisGen, sob o número de registro AC75A1F.

4.1.1. Preparo do extrato metanólico

O preparo e o fracionamento do extrato vegetal por métodos cromatográficos foram realizados no Laboratório de Farmacognosia do Departamento de Princípios Naturais e Toxicologia da FCFAr/UNESP sob orientação e supervisão do Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos.

O extrato metanólico foi obtido a partir da planta seca e triturada pelo método de extração exaustiva por percolação simples (SIMÕES et al., 2017). O processo de extração foi iniciado com o intumescimento prévio dos escapos da planta pulverizados (900 g) com o solvente (metanol) por duas horas antes do início da percolação. O material vegetal intumescido foi depositado no percolador devidamente preenchido com papel de filtro, de maneira rápida e uniforme para que não houvesse a formação de bolhas no interior do mesmo. O início do processo de percolação deu-se após a deposição de mais metanol dentro do

percolador.

A percolação teve duração de 10 dias em temperatura ambiente e em local protegido da luz e com fluxo de gotejamento controlado. A solução extrativa (15 litros) foi filtrada em papel de filtro, concentrada em rotaevaporador sob pressão reduzida em temperatura de 40ºC e liofilizado.

4.2. Fracionamento do extrato metanólico de escapos de *S. nitens*

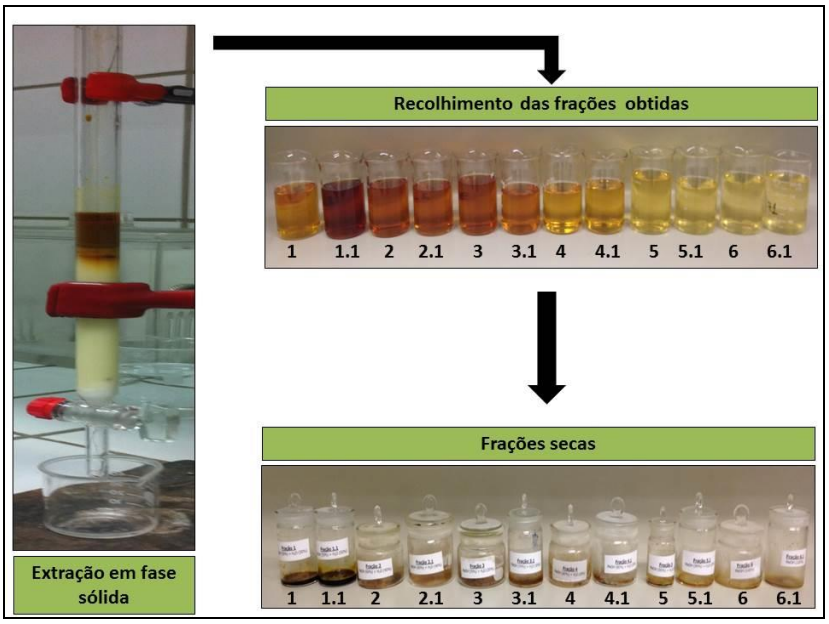
O fracionamento do extrato metanólico preparado a partir dos escapos de *S. nitens* foi realizado por extração em fase sólida (EFS) utilizando uma coluna cromatográfica preenchida com sílica de fase reversa (C18) e como suporte uma coluna de vidro de 20 cm de altura por 5 cm de diâmetro interno. A massa de 10g de fase estacionária foi utilizada para ter a coluna preenchida tendo altura de 10 cm de fase estacionária. A fase móvel foi composta por metanol: água em modo gradiente de eluição - 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10 (v/v) e metanol. A EFS é uma técnica adequada para o fracionamento inicial de amostras complexas, com o objetivo de obter poucas frações, ainda que complexas, mas de composição química distintas.

Foi realizado o preparo de amostra a partir de 5g de extrato metanólico seco, que foi solubilizado em metanol: água (50:50, v/v), seguido da adição de 5g da fase estacionária (C18), sendo esta mistura seca sob fluxo de ar em capela. O sólido resultante do preparo de amostra foi aplicado na coluna cromatográfica.

A coluna cromatográfica foi condicionada com o eluente inicial (metanol: água 50:50) com um volume correspondente ao volume morto (V_m = 130 mL). O volume de 400 mL de cada fase móvel (cerca de 3 vezes o V_m) foi utilizado na eluição, sendo coletadas 6 frações de 200 mL cada (duas frações por eluente = 12 frações). A Figura 9 ilustra o procedimento realizados.

Figura 9. Representação esquemática do fracionamento por EFS em fase reversa (C18) para a

obtenção das frações do extrato metanólico de *S. nitens.*



Fonte: Autor

As frações foram concentradas em evaporador rotativo e, em seguida, secas sob fluxo de ar em capela e em dessecador com sílica gel sob pressão reduzida.

Após a padronização do processo acima descrito, o método foi escalonado para que fosse possível a obtenção de mais massa de frações, neste sentido, um cálculo matemático (Equação 1) foi empregado levando-se em consideração o diâmetro da coluna a ser utilizada, a quantidade de fase estacionaria, fase móvel e volume morto. Esta abordagem forneceu o novo diâmetro de coluna (5,0 cm) para a utilização de 10,0 g de extrato com a mesma eficiência cromatográfica

Equação 1.

$$\frac{m_1}{m_2} = \frac{{d_1}^2}{{d_2}^2}$$

Onde: m_1 refere-se a massa inicial da amostra utilizada, m_2 refere-se a massa final pretendida, d_1 refere-se ao diâmetro inicial e d_2 ao diâmetro da coluna a ser empregada.

4.2.1. Análise por cromatografia em camada delgada

O extrato metanólico e as frações obtidas do fracionamento em coluna foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD). As amostras foram solubilizadas em metanol (5 mg/mL) e aplicadas com auxílio de microseringa (20 µL) nas cromatoplacas de sílica gel (cromatoplacas de alumínio marca Sorbent Technologies®, sílica gel, 200 µm). A eluição foi desenvolvida com seis tipos de sistemas de solventes, como apresentado na Tabela 1, para que se obtivesse a melhor condição de análise.

Tabela 1. Fases móveis empregadas nos ensaios de CCD para o extrato e frações de *S. nitens*

Fase móvel	Composição	Proporção
FM1	hexano + acetato de etila + isopropanol	55:42:3
FM2	acetato de etila + acetona + ácido acético + água*	60:20:10:10
FM3	tolueno + acetato de etila + ácido fórmico	24:56:20
FM4	benzeno + acetato de etila + metanol	18:47:35
FM5	clorofórmio + metanol + água *	43:37:20
FM6	clorofórmio + metanol + *n*-propanol + água *	32:37:6:25

* fase orgânica; FM= Fase móvel

Após a seleção da melhor fase móvel a ser empregada nas análises, o resultado da eluição foi verificado por meio de leitura em luz filtro de luz ultravioleta (UV λ= 254 e 365) , revelador seletivo para flavonoides – NP-PEG e solução de anisaldeído sulfúrico (revelador universal).

4.2.2. Análise inicial do extrato metanólico de *S. nitens* e suas frações por cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a um detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD).

Para registrar os cromatogramas, utilizou-se o cromatógrafo líquido de alta eficiência (analítico, bomba quaternária) modelo PU-2089 (Jasco®), acoplado a detector de arranjo de fotodiodos com faixa de varredura de 195-650 nm modelo MD-2010 (Jasco®). Para a aquisição e processamento dos dados cromatográficos foi utilizado o software EZChrom Elite Client/Server versão 3.1.7 (Chromatec®). A coluna utilizada foi Thermo Hypersil Gold aQ® C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm). O extrato e frações ativas foram solubilizadas em metanol (2,5 mg/mL) e filtrados em membrana de 0,22 µm (PTFE) antes da injeção no cromatógrafo. As

amostras foram injetadas (20 µL) através de um injetor de seis pórticos Rheodyne® 7125 com alça de amostragem de 100 µL.

Nesta investigação foi empregada como fase móvel uma mistura de metanol: água utilizando um gradiente exploratório, sendo de 5-100% de metanol por 50 min, seguido de metanol por 10 min. A vazão foi de 1,0 mL/min. Os comprimentos de onda selecionados para aquisição dos cromatogramas foram 220, 250, 300 e 350 nm.

4.2.3. Análise biomonitorada do extrato metanólico de escapos e das frações de *S. nitens*

O extrato e as frações de *S. nitens* foram submetidos à análise biomonitorada por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de diluição em microplacas de acordo com as metodologias descritas segundo as normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* M27-A3 (CLSI, 2008) e M7-A6 (CLSI, 2006). Estes protocolos foram empregados para os ensaios com as cepas de levedura e a bactéria respectivamente. Neste experimento empregou-se as cepas: *C. albicans,* ATCC 10231 (resistente ao fluconazol), CAV3 (cepa clínica vaginal resistente ao fluconazol), CAS1 (cepa clínica vaginal sensível ao fluconazol) e *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4256. Para a realização destas análises, as amostras vegetais foram solubilizadas em DMSO (10%) na concentração inicial de 2000 µg/mL.

Para determinar a CIM frente à linhagem bacteriana (*L. acidophilus*) os orifícios das microplacas (96 poços) foram preenchidos com 80 µL de caldo Mueller hinton acrescido de 20% de soro fetal bovino Em seguida foram acrescentados 100 µL do das amostras vegetais e realizada a diluição seriada de 1000 a 7,8 µg/mL. Adicionalmente foram distribuídos 20 µL das suspensões dos micro-organismos ($1x10^7$ cel/mL) em cada orifício das microplacas.

Na determinação da CIM para as cepas leveduriformes (*C. albicans*), os orifícios das microplacas foram preenchidos com 100µL de meio de cultura RPMI 1640, ajustado ao pH7,0 com tampão MOPs (ácido 3-[N-morfolino] propanossulfônico). As soluções vegetais foram adicionadas e diluídas da mesma maneira que nos ensaios com a bactéria. Adicionalmente, Adicionalmente foram distribuídos 100 µL das suspensões dos micro-organismos ($1x10^3$ cel/mL) em cada orifício das microplacas.

As microplacas foram incubadas a 36 ºC por 72 horas para os ensaios realizados com a cepa de *L. acidophilus* sob condição de microaerofilia e a 37 ºC por 48 horas para as

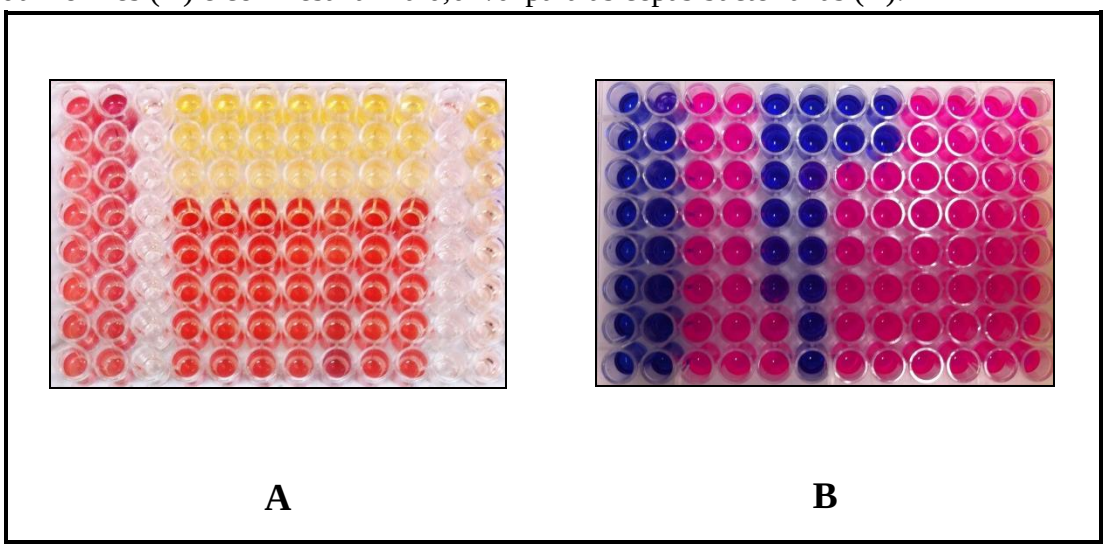
leveduras.

Como controles positivos foram utilizados a ampicilina (50 µg/mL) nos ensaios com a cepa bacteriana e o fluconazol (512 µg/mL) e a anfotericina B (16 µg/mL) para os ensaios com as cepas leveduriformes. Também foram realizados o controle do meio de cultura, o controle de crescimento bacteriano e leveduriforme, o controle de esterilidade das amostras vegetais e o controle negativo (solventes).

Para a revelação destes ensaios foram empregados reveladores resazurina 0,01% (bactéria) e uma solução de 2% de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio – TTC (leveduras), sendo estes reveladores indicativos de viabilidade celular (FUKUSHIMA et al., 2003; DUARTE et al., 2005). Os experimentos foram realizados em triplicata.

A figura 10 representa os ensaios de microdiluição revelados com ambos os reveladores empregados no estudo.

Figura 10. Ensaios de microdiluição revelados com solução de TTC 2% para as cepas leveduriformes (A) e com resazurina 0,01% para as cepas bacterianas (B).



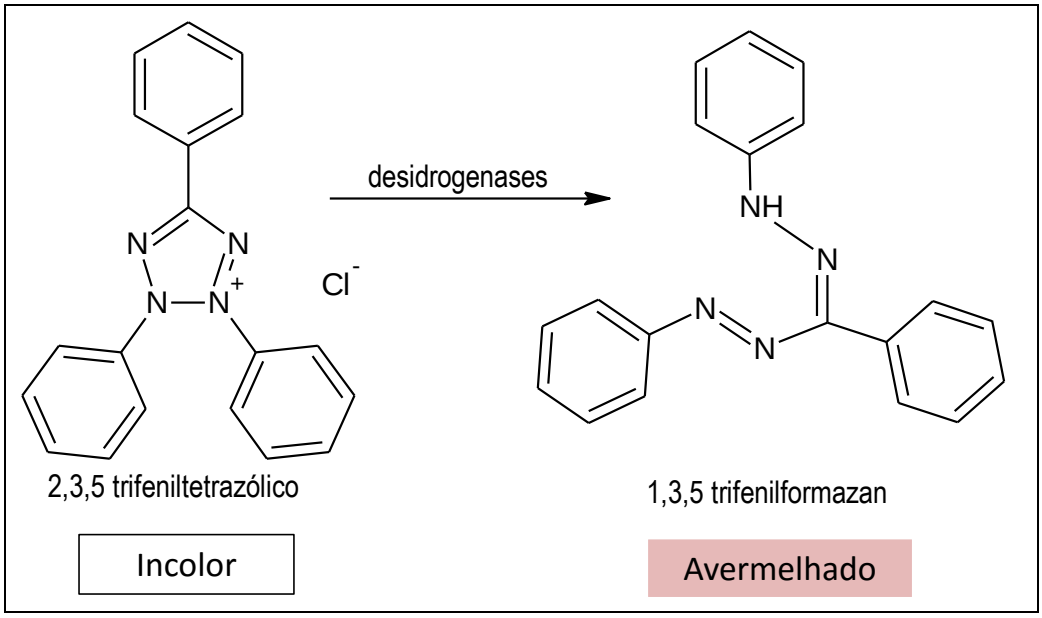
Fonte: O autor

Como observado na Figura 10, os diferentes reveladores utilizados na investigação fornecem os parâmetros de viabilidade celular necessária para que os valores de CIM sejam obtidos.

No caso dos ensaios realizados com as cepas de leveduras, a mudança de coloração do TTC (Figura 10 A) indica o mecanismo redução enzimática do 2,3,5-trifeniltetrazólio (incolor) em 1,3,5-trifenilformazan (cor avermelhada), em tecidos vivos devido à atividade de

várias desidrogenases, enzimas importantes na oxidação de compostos orgânicos e portanto no metabolismo celular (GABRIELSON et al., 2002). A Figura 11 apresenta este mecanismo de redução atribuído ao uso deste revelador nos testes com as cepas leveduriformes.

Figura 11. Reação de redução do XTT

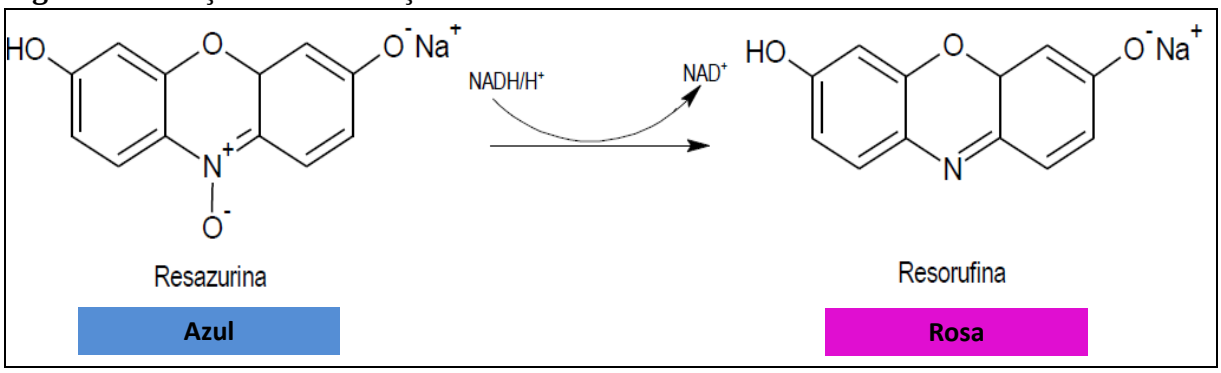


Fonte: O autor

Nos ensaios utilizando bactérias utilizando o revelador resazurina na concentração de 0,01%, também foi possível evidenciar os mesmos parâmetros de ausência e presença de crescimento microbiano.A resazurina (7-hidroxi-3H-phenoxazin-3-ona10-óxido) é considerada o indicador mais utilizado em condições de redução em meios de cultura (FUKUSHIMA et al., 2003). O mecanismo baseia-se na redução da resazurina (cor púrpura) em resorufina (cor rósea) (Figura 10 B). A resazurina tem uma correlação direta com a quantidade/proliferação de organismos vivos, que incluem células bacterianas e até células de mamíferos, e esta propriedade fez com que a mesma fosse considerada como ideal para que os valores de CIM fossem obtidos.

A Figura 12 apresenta o mecanismo de redução da resazurina (cor púrpura) em resorufina (cor rósea).

Figura 12. Reação de oxirredução da resazurina



Fonte: O autor

4.2.3.1. Escolha da fração mais ativa

De acordo com os resultados oriundos da investigação descrita no item 4.2.3, a fração mais ativa (menores valores de CIM) contra as cepas empregadas foi selecionada como a fração mais promissora da investigação e, devido a isso, foi a amostra de escolha para ser empregada nos ensaios biológicos que fazem parte deste estudo.

4.2.4. Análise química da fração ativa eleita como a mais promissora da investigação e do extrato metanólico

Após a escolha da fração mais ativa, uma nova exploração do perfil químico da mesma, e também do extrato metanólico, foi realizado. Para tal, o método de análise por CLAE-DAD desenvolvido por Pacífico et al. (2011) foi então empregado para uma nova análise do extrato metanólico e da fração eleita. Entretanto, utilizou-se uma coluna de fase reversa C18 modelo Luna 2 Phenomenex® (250 x 4,6 mm; 5 µm) protegida com uma coluna de guarda Phenomenex® (4 x 3 mm; 5 µm) e comprimento de onda utilizado foi de 280 nm. O gradiente de eluição empregado nesta etapa da investigação foi desenvolvido utilizando as fases móveis água (A) e acetonitrila (B), nos quais foram acrescentados 0,1% (v/v) de ácido acético: 5% B por 3 min, 5-38% B por 11 min, 38% B por 3 min, 38-42% B por 8 min (modo gradiente) 42% B por 10 min; a partir de 47% B por 5 min. As amostras foram injetadas (20 µL) através de um injetor de seis pórticos Rheodyne® 7125 com alça de amostragem de 100 µL. As amostras foram preparadas conforme descrito no item 4.2.2. deste documento.

4.3. Desenvolvimento do sistema lipídico nanoestruturado (SLN)

Os experimentos de desenvolvimento do sistema lipídico nanoestruturado e incorporação das amostras foram realizados em colaboração com Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica, sob orientação do Prof. Dr. Marlus Chorilli e supervisão da Dra. Patrícia Bento da Silva (Departamento de Fármacos e Medicamentos) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP.

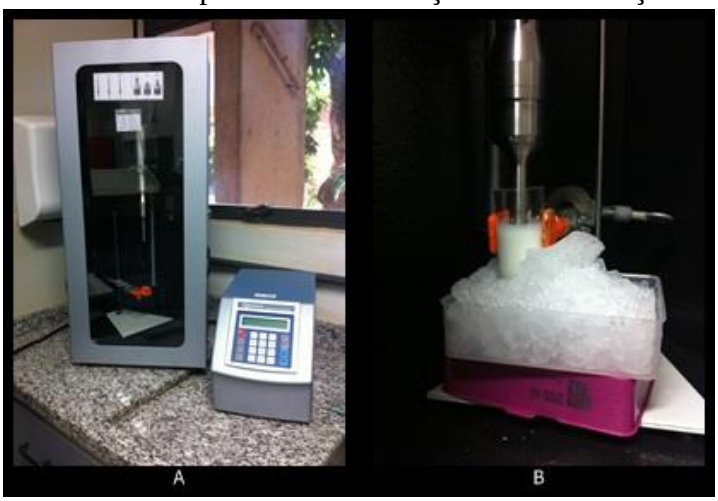
Para o desenvolvimento do SLN empregou-se o colesterol como fase oleosa (FO), 66,7% de polioxietileno 20-cetil éter (Brij 58) + 33,3% de fosfatidilcolina de soja (FS - Epikuron® 200) como tensoativo e uma solução de tampão fosfato (pH 7,4) acrescido de uma dispersão polimérica de quitosana (5%) preparada em solução de ácido acético 1 M como fase aquosa da formulação (FA). A quantidade de dispersão polimérica empregada foi ajustada para cada volume de formulação preparada para que se obtivesse a concentração de 0,25 % na formulação final.

4.3.1. Desenvolvimento das formulações e elaboração do diagrama de fases ternário

Através do desenvolvimento do diagrama de fases ternário, 36 diferentes formulações foram obtidas a partir da variação de concentrações de cada componente que compuseram o sistema, fixando-se a proporção do tensoativo e fase oleosa.

Cada componente das formulações foram pesados e homogeneizados manualmente, e a mistura final foi sonicada usando sonicador de haste (Q500 da QSonica®) (Figura 13) utilizando as seguintes condições: potência de 500 watts, amplitude de 30%, modo descontínuo, por 8 minutos com intervalo de 30 segundos a cada dois minutos de sonicação, com banho de gelo durante todo o processo de sonicação. Inicialmente, os constituintes da fase aquosa e tensoativa foram sonicados por 4 minutos com intervalo de 30 segundos a cada dois minutos, após completa mistura destes compostos, a fase oleosa foi adicionada e repetiu-se o mesmo processo.

Figura 13. Equipamento utilizado e processo de obtenção das formulações



A= Sonicador de haste Q500-QSonica®; B= preparo das formulações
Fonte: O autor

As formulações obtidas foram classificadas visualmente como sistema líquido transparente (SLT), sistema viscoso opaco (SVO), sistema viscoso transparente (SVT), sistema viscoso semitransparente (SVST) e separação de fases (SF). Desse modo, foi possível delimitar as diferentes regiões no diagrama de fases.

A partir da obtenção das 36 formulações classificadas visualmente, duas delas foram selecionadas para proceder-se os ensaios de caracterização farmacotécnica para posterior incorporação das amostras vegetais

4.3.2. Ensaios farmacotécnicos e caracterização das formulações escolhidas

4.3.2.1. Microscopia de luz polarizada (MLP)

Uma gota de cada formulação foi colocada em uma lâmina de vidro coberta com uma lamínula e, em seguida, examinada através do microscópio de luz polarizada Olympus® BX41 acoplado com Seção QColor3 (Olympus America Inc.), a 25 ± 0,5 ºC. Deste modo, o comportamento isotrópico ou anisotrópico das amostras foi obtido (RAMOS et al., 2015).

4.3.2.2 Dispersão de luz dinâmica e ensaio de estabilidade

A caracterização dos sistemas também foi realizada através da análise do tamanho das gotículas via técnica de correlação de fótons, usando equipamento de espalhamento dinâmico

de radiação laser – Light Scattering (Zetasizer Nano NS – Malvern Instruments®). Este método é particularmente sensível para determinar pequenas mudanças no diâmetro médio, tais como aquelas devido às camadas adsorvidas na superfície da partícula ou pequenas variações no processo de manufatura. Quando um feixe de luz passa através de uma dispersão coloidal, as partículas ou gotas espalham a luz em todas as direções. É possível, então, observar flutuações tempo-dependentes na intensidade do espalhamento através de um detector que processa os dados e envia a um computador. A partir dessa técnica, calculou-se o raio hidrodinâmico das partículas coloidais da equação de Stokes-Einstein (Equação 2):

Equação 2:

$$\mathbf{D} = KT/6\pi\eta Rh$$

Sendo que: D= coeficiente de difusão das partículas; K= constante de Boltzmann (1,3807 x 10^{-23} NmK^{-1}); T= temperatura absoluta (293,15 K); π= 3,141592; η= viscosidade (1,002 x 10^{-3} NM^{-2s}); Rh= raio hidrodinâmico.

As formulações foram analisadas em um analisador de gotículas. As amostras foram colocadas na câmara de análise de modo que o feixe de laser atravessasse a dispersão em toda a sua extensão. A temperatura do sistema foi mantida a 20 °C, o comprimento de onda do laser foi de 532 nm e o índice de refração de acordo com o índice observado para cada amostra analisada. Foram realizadas 10 determinações do diâmetro médio e índice de polidispersidade (IPD) das gotículas de cada amostra (n = 3), com a duração total de 5 min.

Após o período de três meses, as formulações foram novamente avaliadas quanto a sua estabilidade e dessa forma observar possíveis alterações no diâmetro das partículas (BONIFÁCIO et al., 2015).

4.3.2.3. Análise do potencial Zeta (PZ)

O potencial Zeta foi determinado a partir da mobilidade eletroforética, utilizando equipamento Zetasizer Nano NS, Malvern Instruments, Malvern, UK, sendo que as análises foram realizadas 24 horas após o preparo (tempo 0) e 3 meses (tempo 3) posteriores a fim de

verificar a estabilidade deste parâmetro nas formulações analisadas. As amostras foram previamente diluídas (10 μL/mL) com solução aquosa de KCl para manter uma constante de força iônica durante a análise. As amostras foram colocadas na célula eletroforética e foram realizadas 3 determinações do potencial de superfície para cada amostra, calculando-se a média e o desvio padrão.

O PZ indica as cargas elétricas entre a superfície da partícula e o meio específico, estando diretamente envolvido na estabilidade física das partículas, este pode ser influenciado por alterações que possam ocorrer na interface com o meio dispersante, ou seja, na dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou na adsorção de possíveis espécies iônicas presentes no meio aquoso (OBEIDAT et al., 2010).

4.3.2.4. Avaliação *in vitro* da força mucoadesiva

Para a realização deste ensaio foi utilizada a mucosa vaginal de suíno, cedida por um frigorífico local, o emprego deste material foi autorizado pelo Comitê de Ética do Uso de Animais da FCFAr (CEUA). A força necessária para remover o sistema selecionado da superfície da mucosa vaginal (força mucoadesiva) foi avaliada *in vitro*, utilizando o analisador de textura TA-XT plus® (Stable Micro Systems, Surrey Inglaterra), no modo *Adhesion Test*. Todas as amostras foram testadas na forma não incorporada e incorporada com o derivado vegetal, a uma temperatura de 37 ± 0.5 ºC.

Uma região com 2 mm de espessura de mucosa vaginal foi fixada na parte inferior da sonda do equipamento e hidratada com muco vaginal artificial (MVA) por 30s. Em seguida iniciou-se o teste abaixando a sonda do equipamento a uma velocidade constante (1 mm s^{-1}) até entrar em contato com a superfície da amostra (formulações incorporadas e não incorporadas). A mucosa e a amostra foram mantidas em contato durante 60 segundos e nenhuma força foi aplicada durante este intervalo. Após 60 segundos, a sonda subiu a uma velocidade de 0.5 mm s^{-1} até que o contato entre as superfícies da mucosa e da formulação fosse cessado, e então essa força mucoadesiva necessária para ocorrer o destacamento foi medida, refletindo a característica mucoadesão. Este ensaio foi realizado em sete repetições as quais foram analisados a 37 ± 0,5 °C a fim de mimetizar a temperatura corporal do ser humano.

4.3.2.5. Ensaios reológicos

4.3.2.5.1. Análise reológica contínua

Foram obtidos reogramas das formulações escolhidas empregando reômetro AR2000ex (TA Instruments) no modo *fluency (flow)*, e de acordo com a consistência de cada formulação, utilizou-se geometria cone/placa e placa/placa, a temperatura de 37 ºC. Cautelosamente, colocou-se uma pequena amostra do sistema em análise sobre a base inferior do reômetro, aguardou-se 3 minutos em repouso, para ambientalização da amostra com a temperatura do equipamento, sendo esta a desejável durante a realização do experimento. A taxa de cisalhamento utilizada para a curva ascendente foi de 0 a 100 1/s. O comportamento de fluxo do material é dado através da análise de um gráfico, chamado curva de fluxo, que correlaciona a tensão de cisalhamento com a taxa de cisalhamento (SALMAZI et al., 2015).

A partir dos reogramas obtidos, foram calculados os valores de *n* para verificar o comportamento de fluxo e o valor de *k* para verificar a viscosidade do material conforme equação 1, onde o *k* é um parâmetro relacionado à consistência (índice de consistência) e *n* é o índice de escoamento. Neste modelo, $n > 1$ representa um fluido dilatante, $n < 1$ representa fluido pseudoplástico, e $n = 1$ fluido newtoniano (CARVALHO et. al., 2009).

4.3.2.5.2. Análise reológica oscilatória

Neste experimento foram empregadas as mesmas condições de geometria de placa, temperatura e equipamento que foram realizadas nos ensaios de reologia contínua. Entretanto, para a realização do teste de varredura de tensão, colocou-se o reômetro no modo *amplitude sweep*, podendo assim determinar a região viscoelástica. Foi utilizada uma faixa de tensão de cisalhamento de 0 a 50 Pa e frequência de 1 rad/s. Posteriormente, com a determinação da tensão de 1 Pa da região viscoelástica, colocou-se o reômetro no modo *frequency sweep* para a realização do teste de varredura de frequência, para a determinação do módulo elástico (G') e módulo viscoso (G''). Para esse teste foi utilizada a faixa de frequência de 0 a 10 Hz, à tensão de 1 Pa.

A análise reológica oscilatória investiga as propriedades viscoelásticas e materiais das formulações, o que traz informações quanto à natureza estrutural do sistema, implicando diretamente no desempenho da formulação (SCHRAMM et al., 2006). Essa informação é

obtida através da análise do módulo elástico (G') e do módulo viscoso (G'') obtidos nesse ensaio. O módulo elástico, G', é denominado módulo de armazenagem, representando tanto a energia armazenada durante a deformação quando a tensão aumenta, quanto a energia liberada quando a tensão é relaxada. Já o módulo viscoso G'' é o elemento viscoso que não pode armazenar energia, pois a tensão aplicada se dissipa na forma de deformação irreversível (PÉNZES et al., 2004). Pode-se também calcular o módulo de cisalhamento dinâmico viscoso ou de perda (G"), que indica o caráter líquido do material (BONTORIN et. al., 2009).

4.3.2.6. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

As amostras foram diluídas previamente em tampão PBS pH 7,4 e em seguida foram colocadas na grade de cobre de 200 mesh e deixadas em repouso até adsorção, e então o excesso foi removido com papel de filtro. Subsequentemente, uma gota de uma solução a 1% (p/v) de acetato de uranila foi adicionado para contrastação negativa. Depois de 2 minutos o excesso foi removido e a amostra foi seca à temperatura ambiente. As análises foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura com aceleração de 100 kV e aumento de 100.000 vezes (ELOY et al., 2016).

4.4. Ensaios biológicos

4.4.1. Análise do potencial antimicrobiano dos derivados vegetais incorporados nos sistemas nanoestruturados selecionados

Para a avaliação da atividade antimicrobiana do extrato vegetal e da fração eleita como a mais ativa, foi procedido a incorporação de ambos derivados vegetais ao às formulações previamente selecionadas. A incorporação dos derivados vegetais às formulações (2000 µg/mL) foi realizada na fase aquosa do sistema no momento do preparo das formulações anteriormente à deposição da fase oleosa (processo descrito no item 4.3.1).

Nesta etapa, o ensaio de determinação do potencial antimicrobiano (obtenção da CIM, CBM e CFM) foi realizado nas mesmas condições dos experimentos desenvolvidos na determinação dos valores de CIM das frações (item 4.2.1), entretanto, além das cepas de *C. albicans* (ATCC 10231, CAV3 e CAS1) e de *L. acidophilus* ATCC 4356, mais duas cepas clínicas de *C. albicans* (Urine 1 e Urine 2) e uma cepa de *Gardnerella vaginallis* (BME-1)

foram adicionadas à investigação.

Para avaliar a atividade contra cepas de *Candida* não-*albicans* diferentes espécies foram também adicionadas à investigação, sendo elas representadas por uma cepa padrão (ATCC) e uma cepa clínica isolada de ambiente vaginal de casos de CVV: *C. krusei* (ATCC 6258 e CKV); *C. glabrata* (ATCC 2001 e CGV); *C. tropicalis* (ATCC 750 e CTV) e *C. parapsilosis* (ATCC 22019 e CPV)

Todas as cepas clínicas de origem nacional empregadas neste estudo foram cadastradas no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado-SisGen, sob os números de registro AF3561F e AAD29ED.

O ensaio com a cepa de *G. vaginallis* foi realizado empregando os compostos vegetais incorporados e não incorporados nas mesmas concentrações anteriormente utilizadas (faixa de 1000 a 7,8 µg/mL). Entretanto, empregou-se o meio de cultura caldo de infusão cérebro coração (caldo BHI) e as condições de incubação foram em câmara de anaerobiose (24 horas), visto a necessidade deste tipo de condição para este micro-organismo.

Para obtenção da CFM e CBM, com auxílio de hastes de madeira estéreis a mistura de cada poço foi repicada sob a superfície de Ágar Sabouraud Dextrose – ASD (leveduras) ágar BHI (*G. vaginalis*) e ágar MRS (*L. acidophilus*). As placas foram incubadas nas mesmas condições do experimento de microdiluição por 24h.

4.4.2. Determinação do mecanismo de ação dos derivados de S. nitens não incorporados e incorporados sobre *C. albicans*

Os ensaios empregados foram realizados com metodologias que mostraram o envolvimento direto desses compostos com a estrutura da parede celular de *Candida* (teste com sorbitol) ou com a permeabilidade de íons à membrana dos micro-organismos (teste com ergosterol). Os ensaios foram desenvolvidos com cepa padrão de *C. albicans* ATCC 10231 e com uma cepa clínica da mesma espécie isolada de ambiente vaginal (CAV).

4.4.2.1. Ensaio com sorbitol

As microplacas foram preparadas da mesma maneira descrita nos experimentos de determinação da CIM de acordo com o protocolo M27-A3 (CLSI, 2008), com modificações. Os derivados de *S. nitens* não incorporados e incorporados nas formulações F1 e F9 foram

adicionados aos poços das microplacas em concentrações de 1000 μg/mL a 0,48 μg/mL. Em seguida foram adicionados 100 μL das suspensões fúngicas (10^3células/mL) preparadas em meio RPMI 1640 suplementado com 0,8 M de sorbitol. As microplacas foram incubadas à 35º C e leituras foram realizadas após o período de 48 horas e 7 dias (CASTRO et al., 2015).

4.4.2.2. Ensaio com ergosterol

As microplacas foram preparadas da mesma maneira que descrita nos ensaios de determinação da CIM, de acordo com o protocolo M27-A3 (CLSI, 2008) com modificações. Os derivados de *S. nitens* não incorporados e incorporados nas formulações nanoestruturadas foram adicionados aos poços das microplacas em concentrações de 5000 μg/mL a 2,44 μg/mL. Subsequentemente, foram adicionados 100 μL das suspensões fúngicas (10^3células/mL) preparadas em meio RPMI 1640 suplementado com 200 μg/mL de exógenos de ergosterol. As microplacas foram incubadas á 35º C e leituras foram realizadas após o período de 48 horas (CASTRO et al., 2015).

4.4.3. Análise do potencial anti-biofilme de Fr3

4.4.3.1. Ensaio de inibição de biofilmes monotípicos

4.4.3.1.1. Formação dos biofilmes

Neste ensaio foram empregadas as cepas de *C. albicans*: ATCC 10231, CAV3 e CAS1. O método de formação do biofilme foi realizado segundo as considerações de Pitangui et al. (2013) e Toledo et al. (2016) com modificações.

Inicialmente, foi preparado as suspensões fúngicas das leveduras na concentração de 5,0 x 10^8 cel/mL^{-1} em solução salina estéril para que 100μL das mesmas fossem depositados em placas de 96 poços. As microplacas contendo as suspensões fúngicas foram incubadas sob rotação (80 RPM) a 37ºC durante 2 horas para promover a pré-adesão das células leveduriformes na superfície dos poços.

Após este período, o sobrenadante foi removido de cada poço e, em seguida, 100 μL de meio RPMI 1640 foram adicionados e procedeu-se a incubação das mesmas à 37° C por 48 horas, incluindo troca do meio RPMI depois de transcorridas 24 horas.

4.4.3.1.2. Tratamento e avaliação da atividade sobre biofilmes maduros

Após o período de incubação de 48 horas obtiveram-se biofilmes maduros e espessos sobre a superfície dos poços, dos quais o meio de cultura foi removido e procedeu-se a lavagem dos mesmos (cuidadosamente) com 100µL de solução salina estéril (0,9%) para a remoção de células planctônicas não aderidas.

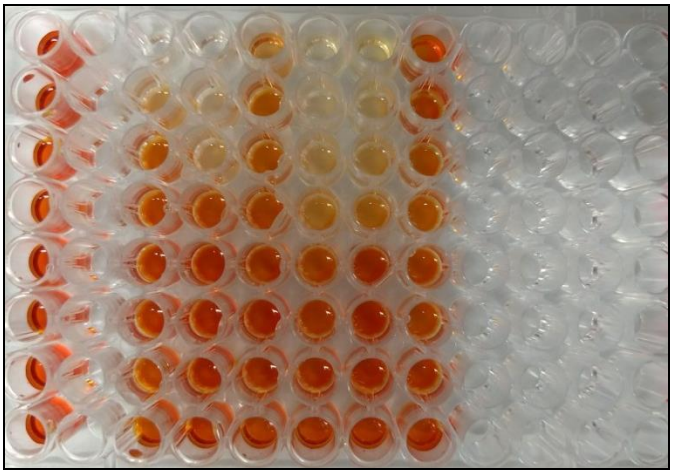
Foram adicionados 100µL de meio de cultura contendo a fração ativa incorporada e não incorporada nos dois SLN desenvolvidos, nas concentrações de 2,5 a 0.6 mg/mL (diluições seriadas). As microplacas foram novamente incubadas durante 24 horas a 37 °C. Como controle positivo foi utilizado anfotericina B nas concentrações de 16 a 0.1 mg/mL. Também foram realizados controles com os SLN puros e com o DMSO à 20%

Os ensaios foram executados em triplicata e a revelação dos mesmos foi feita através do ensaio de redução do 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -5- [carbonilo (fenilamino)]-2H-tetrazólio-hidróxido (XTT®). A presença de viabilidade fúngica foi representada pela coloração vermelha e ausência da mesma manteve os poços incolores. A intensidade da coloração obtida após o período de incubação de 4 horas foi mensurada empregando os valores de absorbância obtidos de uma leitura a 490 nm em espectrofotômetro de microplacas (Epoch 2 - Microplate Spectrophotometer, BioTek Instruments, Inc., Winooski, USA).

Os valores obtidos das leituras espectrofotométricas foram utilizados para a realizado do cálculo de inibição dos biofilmes, empregando os controles positivos de crescimento como 100% de viabilidade.

A Figura 14 representa um teste revelado com o XTT aonde é possível observar a viabilidade celular (coloração vermelha) e a ausência da mesma (ausência de coloração).

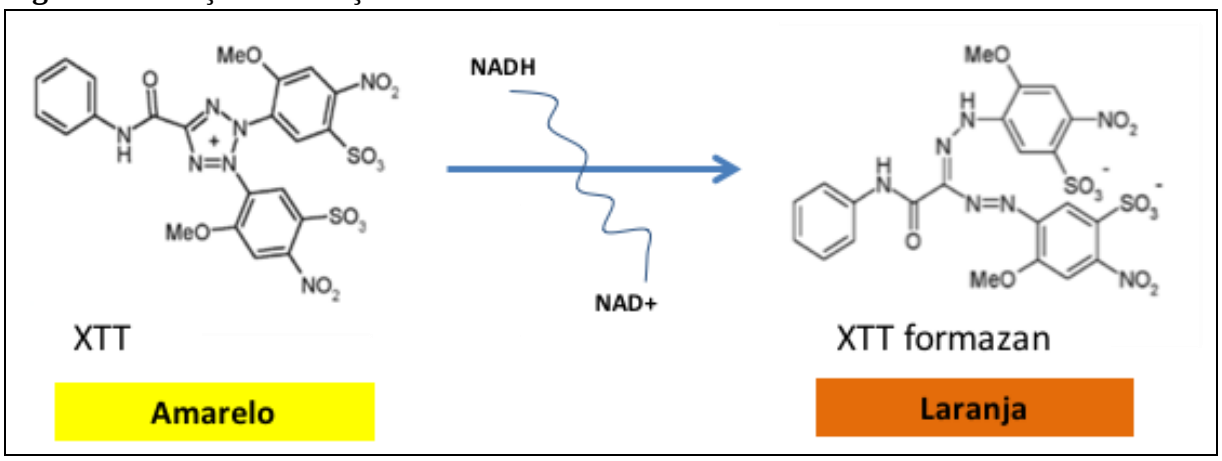
Figura 14. Representação de um ensaio de inibição de biofilmes em placas de 96 poços revelado com XTT



Fonte: O autor

O emprego do teste de redução do XTT tem sido usado como ferramenta de rotina para a quantificação de biofilmes de *Candida* uma vez que a adição do mesmo aos mais diversos tipos de biofilmes de *Candida* é possível determinar a atividade celular dos mesmos, e consequentemente a sua viabilidade. A redução intracelular do XTT ocasionado pela ação das enzimas mitocondriais (desidrogenases) que liberam o composto formazam, o qual pode ser quantificado por estimativa colorimétrica (SILVA et al., 2008). A figura 14 apresenta a reação XTT.

Figura 15. Reação de redução do XTT



Fonte: Adaptado de Klein et al. (2012).

4.4.4. Aprimoramento dos estudos da ação dos derivados de *S. nitens* sobre biofilmes associados com a CVV

Em vista da problemática dos biofilmes no cenário das doenças infecciosas, em

especial nos quadros clínicos da CVV, o presente trabalho investigativo teve uma extensão dos estudos voltados a este tema durante a realização do Doutorado sanduíche do autor desta Tese, o qual foi realizado no Centro Médico da Universidade de Groningen (UMCG-Holanda) no Departamento de Engenharia biomédica do Instituto J. W. Kolff (University of Medical Center Groningen - Department of Biomedical Engineering of the J. W. Kolff Institute – UMCG, Groningen, The Netherlands) sob orientação e supervisão do Prof. Dr. Ir. Hendrik (Henk) Jan Busscher e co-orientação da Profa. Dra. Henny C. Van der Mei.

O Doutorado sanduíche foi realizado no período de 09/01/2017 a 08/01/2018 (12 meses) sendo financiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo por meio da Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior – BEPE/FAPESP (Processo 2016/17103-9).

Os métodos discorridos a seguir (de 4.4.3.1. a 4.3.3.4.5.2.) são referentes aos experimentos realizados no período acima referido.

4.4.4.1. Determinação da interferência dos derivados de *S. nitens* na adesão de *C. albicans* em superfície

4.4.4.1.1. Micro-organismo e condições de crescimento

Uma colônia isolada de uma cultura de *C. albicans* ATCC 10231 semeada em Tryptic Soy Agar (TSA) foi cultivada em 10 ml de Yeast Nitrogen Base (YNB) durante 24h a 30 ° C sob rotação (150 rpm). Esta cultura foi subsequentemente utilizada para inocular 200 ml de YNB, que foi incubado nas mesmas condições de crescimento durante 16h.

Ao final do perirodo de incubação, a cultura em meio líquido foi submetida a centrifugação (5000 x g) 3x durante 5 min cada, utilizando solução tamponada de PBS (pH= 7.0) nos intervalos de cada rodada. Ao final, o pelet de *C. albicans* foi resuspendido em 10 mL de PBS e a concentração do mesmo foi mensurada em câmara de Neubauer (Counting Burker Chamber). Uma suspensão contendo $3x10^6$ leveduras/mL (200 mL) foi preparada em tampão PBS, qual foi utilizada nos experimentos.

4.4.4.1.2. Cinética de adesão de *C. albicans* em superfície sob condições de fluxo (Ensaio de adesão em câmara de fluxo – Flow chamber)

4.4.4.1.2.1. Câmara de fluxo e adição dos derivados vegetais

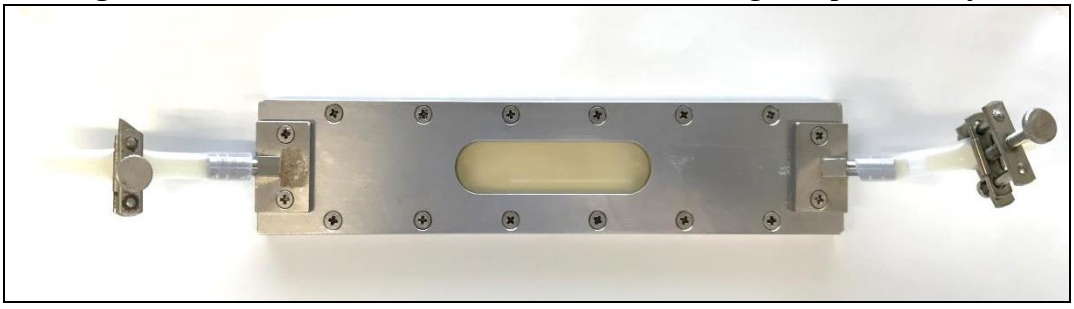
Para avaliação da interferência dos derivados de *S. nitens* (extrato e fração mais ativa) na deposição de *C. albicans* ATCC 10231, uma câmara de fluxo feita de aço inoxidável (dimensões= 175 × 17 × 0,75 mm) composta por duas placas de vidro dispostas paralelamente. As placas de vidro e o espaçador de Teflon (espessura, 0,075 cm) foram limpas por em banho ultrassônico imersas em uma solução de RBS 25 a 2% por 10 min. Após este período as mesmas foram enxaguadas completamente com água estéril a fim de promover a retirada completa do sabão, seguido de metanol e água desmineralizada para que finalmente se tornassem seguras para compor a câmara de fluxo.

O vidro é considerado o melhor material para constituir câmaras de placas paralelas em ensaio de inibição da adesão de micro-organismos em condições de fluxo (BUSSCHER; MEI, 2006), e, placas de vidro preparadas desta forma torna-se completamente molháveis por água (ângulo de contato= 0) e suscetíveis a promoção de monocamadas de substancias antimicrobianas (SONG et al., 2016).

As laminas de vidro foram acondicionadas nas partes superior e inferior da câmara de fluxo, e em seguida ambas as partes foram dispostas paralelamente e separadas pelo espaçador de teflon. O sistema foi fechado e em seguida a câmara foi preenchida com 5 ml de cada derivado vegetal (incorporado e não incorporado nos sistemas nanoestruturados) de maneira homogênea e sem a presença de bolhas.

A câmara fechada foi mantida à temperatura ambiente para adsorção dos mesmos (1 mg/mL) por um período de 16 h. A Figura 16 ilustra uma câmara de fluxo montada contendo os derivados vegetais para adsorção e criação da monocamada.

Figura 16. Câmara de fluxo contendo as amostras vegetais para adsorção



Fonte: O autor

4.4.4.1.2.2. Ensaio cinético de adesão sobre condição hidrodinâmica de fluxo

A câmara de fluxo foi fixada em um microscópio de contraste de fase (BH2-RFCA, Olympus Optical Co., Tóquio, Japão), equipado com uma câmera CCD (A101F, Basler AG, Ahrensburg, Alemanha) a fim de promover a observação (objetiva = 10X) em tempo real da aderência das células leveduriformes a superfície de vidro sem a presença (controle positivo de adesão) com a presença da monocamada das amostras vegetais adsorvidos sobre a superfície (testes) e em vidro com uma monocamada de amostras de (incorporados e não incorporados nos sistemas nanoestruturados) (SONG et al., 2016).

Um fluxo livre de pulso foi criado por pressão hidrostática, o que produziu uma taxa de cisalhamento constante de 15 s^{-1} e a suspensão fúngica foi recirculada usando uma bomba peristáltica modelo Multiperpex modelo 2115. As imagens foram capturadas a cada minuto durante duas horas e armazenadas no computador.

O sistema de fluxo foi composto por sete componentes essenciais:

Componente 1: Recipiente contendo solução tampão PBS, utilizados para promover o balanço hidrostático inicial no sistema;

Componente 2: Recipiente 1 contendo a suspensão fúngica que compõe o equilíbrio e manutenção do fluxo hidrostático;

Componente 3: Bomba peristáltica que promove a estabilização do equilíbrio hidrostático em condições de fluxo;

Componente 4: Câmara de captura de imagens em tempo real;

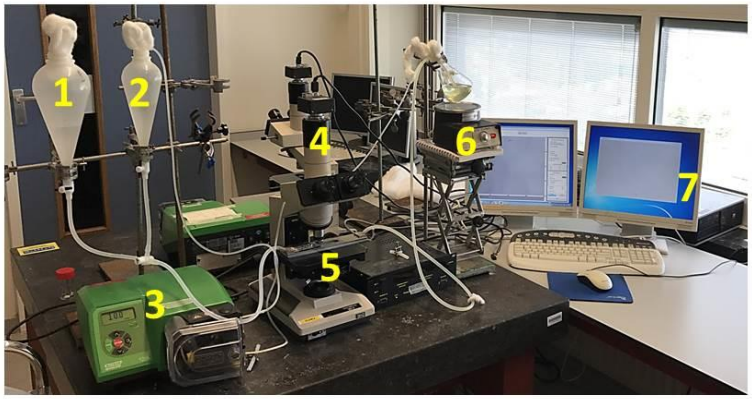
Componente 5: Câmara de placa paralelas fixada no microscópio;

Componente 6: Recipiente 2 contendo a suspensão fúngica que completa o equilíbrio do fluxo hidrostático;

Componente 6: Software em computador que promove o armazenamento das imagens.

A Figura 17 apresenta o sistema de fluxo completo que foi utilizado neste experimento.

Figura 17. Sistema de fluxo hidrostático com monitoramento em tempo real



1. Recipientes contendo tampão PBS
2. Recipiente 1 contendo a suspensão fúngica
3. Bomba peristáltica
4. Microscópio com câmera acoplada
5. Recipiente 2 contendo a suspensão fúngica (balanço hidrostático)
6. Software de armazenamento de imagens

Fonte: O autor

Ao final do período de 2 horas, cada imagem (1024 pixels) foi contada e o número de células leveduriformes aderidas na área observada foi contabilizado em número de leveduras aderidas/cm^{-2}, levando-se em consideração os parâmetros da área observada, o fator da objetiva do microscópio (156), o pixel das imagens obtidas (1024) e o numero de células aderidas. A equação 3 apresenta o cálculo realizado.

Equação 3:

$$\text{Leveduras aderidas/cm}^{-2} = \frac{NCA \times NP}{FAM}$$

Sendo que: NCA= número de células aderidas; NP= número de pixels da imagem; FAM= fator da objetiva do microscópio.

4.4.4.1.2.3. Análise de adesão final

Após 2 horas do fluxo das leveduras no sistema, o número de células aderidas na

superfície foi determinado e a suspensão foi drenada do sistema, o que permitiu que uma interface ar-líquido passasse sobre o substrato (isto é, ocorreu a exposição a uma força de corte elevada). Após a drenagem, a câmara de fluxo foi preenchida com uma nova solução de tampão PBS livre de células e novas imagens foram capturadas em diferentes posições da extensão da superfície.

O número de leveduras aderidas obtidas nas imagens de pós-drenagem a partir dos experimentos com os derivados vegetais foi comparado com o grupo controle (vidro limpo), para mostrar as células aderentes restantes após o final de cada experimento. Estes resultados foram expressos em porcentagem, considerando o número de células aderidas em vidro limpo como 100% de adesão.

4.4.4.2. Análises das monocamadas contendo os derivados vegetais sobre a superfície

Para a realização dos ensaios a seguir, as superfícies foram preparadas da mesma maneira descrita no item 4.4.3.1.2.1. deste documento.

4.4.4.2.1. Determinação do ângulo de contato de água sobre as monocamadas

A fim de determinar a característica física das monocamadas (perfil hidrofílico ou hidrofóbico) os ângulos de contato da água foram medidos nas amostras de vidro contendo as amostras adsorvidas pela técnica de queda séssil.

Neste experimento, uma gota de água purificada foi devidamente depositada sobre a superfície de um sólido por meio de uma micro seringa (1 a 15 ul). A deposição desta gota foi observada com uma lente de baixo aumento, e o ângulo de contato da mesma em sobre a superfície foi medido através de um goniômetro que forneceu o ângulo obtido após a deposição. Foram realizadas 7 determinações para cada amostra, as quais foram foram feitas em diferentes partes sob a extensão da superfície produzindo um desvio padrão médio de 2 e 3 graus em ângulos de contato avançando e recuando, respectivamente.

4.4.4.2.1. Espectroscopia de fotoelétrons de raios-X (XPS)

A fim de complementar os resultados obtidos nos experimentos de ângulo de contado da agua, uma nova metodologia foi empregada para promover a avaliação da composição elementar das monocamadas.

A avaliação de XPS foi realizada utilizando o vidro limpo (sem a presença dos derivados vegetais) e com as amostras, utilizando um espectrômetro *S-Probe* (Surface Science Instruments, Mountain View, CA, EUA) de acordo com as observações de Everaert et al. (EVERAERT; MEI; BUSSCHER, 1998). As energias de ligação foram determinadas estabelecendo a energia de ligação do C1s em 284,8 eV. A composição da superfície elementar foi expressa em percentagem atômica, ajustando % C + % O +% Si +% N a 100%.

4.4.4.3. Avaliação do potencial antimicrobiano sobre biofilmes associados com a CVV

Com a finalidade de formar-se biofilmes semelhantes aos que ocorrem no ambiente vaginal, especialmente nos casos de candidíase vulvovaginal, novos biofilmes foram desenvolvidos utilizando os seguintes micro-organismos: *C. albicans* ATCC 10231, *Lactobacilus acidophilus* ATCC 4356 e *Gardnerella vaginalis* BME-1.

Foram criados biofilmes monotípicos de *C. albicans*, e biofilmes heterotípicos compostos por *C. albicans* + *L. acidphilus* (MIX 1) e *C. albicans* + *G. vaginallis* (MIX 2).

4.4.4.3.1. Micro-organismos e condições de crescimento

A cepa de *L. acidophilus* foi cultivada em caldo MRS em uma atmosfera que continha 5% de CO2 (24 h, 37 ° C). *G. vaginalis* foi cultivada anaerobicamente em caldo TSB (24 h, 37 ° C). *C. albicans* foi cultivado em caldo TSB (24 h, 30 ° C).

Todos os micro-organismos foram cultivados em 10 mL de seus respectivos meios, e após o período de incubação, dois ml desta pré-cultura foram utilizados para inocular 75 ml dos respectivos meios (16h, 37 ° C para estirpes bacterianas e 16h, 30 ° C a 150 RPM para a levedura) novamente nas condições apropriadas.

Os micro-organismos foram centrifugados e lavados três vezes usando solução tampão

PBS estéril (6.500 RPM para bactérias e 5.000 xg para levedura, 5 min, 10 ˚C) e ressuspensos em 5 mL de tampão PBS. As suspensões bacterianas foram sonicadas em contato com gelo, três vezes durante 30 W. Este procedimento não promove a lise das células, o mesmo é necessário para que células individuais sejam obtidas.

4.4.4.3.2. Preparação das suspensões microbianas

A partir das culturas microbianas previamente centrifugadas, a concentração de cada micro-organismo foi mensurada, e suspensões foram preparadas nas concentrações de $1x10^7$ bactérias/mL e $2x10^7$ leveduras/mL em tampão PBS estéril

4.4.4.3.3. Formação *in vitro* dos biofilmes maduros

Nesta etapa do estudo, todos os biofilmes maduros foram formados na superfície do poço de placas de polietileno de 24 poços.

4.4.4.3.3.1. Biofilmes monotípicos

Para a formação dos biofilmes monotípicos de *C. albicans, L. acidophilus e G. vaginallis,* 1mL das suspensões bacterianas ($1x10^6$ células/mL) e fúngica ($2x10^6$ células/mL) foram depositadas aos poços das placas e incubados durante duas horas nas mesmas condições de crescimento descritas anteriormente (item 4.3.3.1.) para promover a pré-adesão dos micro-organismos na superfície

Após o período de pré-adesão, o conteúdo dos poços foi cuidadosamente removido de maneira que apenas os micro-organismos aderidos permanecessem na superfície e, em seguida, 1 mL de caldo TSB (para *C. albicans e G. vaginalis*) e MRS (para *L. acidophilus*) foram depositados aos poços e as placas foram incubadas nas mesmas condições de crescimento durante 24 h para dar início ao processo de formação. Passadas 24 h, o meio de cultura foi removido e substituído por 1mL de meio fresco seguindo-se para mais 24 h de incubação. Ao final de 48 horas de incubação, os biofilmes maduros foram cuidadosamente lavados com 1 mL de solução tampão PBS para a remoção de células e fragmentos não aderidos na superfície.

4.4.4.3.3.2. Biofilmes heterotípicos

Para a formação dos biofimes heterotípicos (*C. albicans* +*G. vaginalis* – MIX 1 e *C. albicans* + *L. acidophilus* – MIX 2) , iguais volumes das suspensões padronizadas ($1x10^6$ células/mL para as bactérias) ($2x10^6$ células/mL para a levedura) foram adicionas aos poços das placas (volume total=1 mL) (ADAM; BAILLIE; DOUGLAS, 2002). Todas as etapas referentes à duração do processo de pré-adesão e formação foram as mesmas que as dos biofilmes monotípicos, entretanto, para o meio de cultura escolhido para o crescimento destes tipos de biofilmes foi o TSB, uma vez que estudos preliminares mostraram que este meio possui a capacidade de promover o crescimento de ambos os micro-organismos, o que o tornou ideal para a formação destes biofilmes polimicrobianos.

Os biofilmes MIX 1 foram incubados em uma atmosfera que continha 5% de CO_2 (37 ° C) e os MIX foram incubados em estufa de anaerobiose (37 ° C). A escoha destas condições de adesão deu-se pelo fato de que era necessário favorecer o crescimento de ambos os micro-organismos, e visto a plasticidade apresentada por *C. albicans* em crescer em ambos os tipos de ambientes (aeróbico, anaeróbico e microaerofilia) esta escolha não interferiu na condição de crescimento da mesma (DUMITRU et al., 2004).

4.4.4.3.3.3. Determinação da formação dos biofilmes

Para confirmar a formação dos biofilmes formados como descrito anteriormente, as técnicas de determinação da biomassa total com o uso do ensaio de coloração com solução de cristal violeta e tomografia por coerência óptica foram empregadas.

4.4.4.3.3.3.1. Obtenção da biomassa total

A biomassa total dos biofilmes formados após 48 h foi mensurada pelo ensaio de coloração do cristal violeta de acordo com as considerações de Freires e colaboradores, com algumas modificações (FREIRES et al., 2014).

Após o período formação, o conteúdo dos poços foi descartado e os biofilmes aderidos foram lavados duas vezes com tampão PBS estéril e secos durante 45 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 1 ml de 0,4% de uma solução de cristal violeta em cada

poço e procedeu-se a incubação incubou-se durante 45 minutos. Após este período, os poços foram novamente lavados duas vezes com tampão PBS e logo em seguida 1 mL de etanol a 95% foi adicionado para promover a remoção do cristal violeta fixado aos biofilmes.

Após 45 minutos, as soluções em etanol foram transferidas para os poços de uma nova placa e a absorbância de cada poço foi mensurada a 570 nm num leitor de microplacas Fluostar (BMG Labtech).

4.4.4.3.3.3.2. Determinação da espessura dos biofilmes por tomografia por coerência óptica (TCO)

Ao final de 48 h de formação, os biofilmes foram cuidadosamente lavados e os poços foram preenchidos com 2 mL de solução tampão PBS. As imagens dos biofilmes foram obtidas em um tomógrafo de coerência óptica Ganimé II (Thorlabs Ganymade, Newton, NJ, EUA).

A lente do tomógrafo foi posicionada no centro do poço contendo o biofilme, e a medida que o mesmo foi visualizado, imagens foram capturadas em 10 diferentes posições da área do poço (1,9 cm^{-2}).

A espessura dos biofilmes foi determinada com base nas imagens obtidas nas 10 varreduras utilizando o software Image J (National Institutos de Saúde, Bethesda, MD, EUA), cobrindo a toda a área do substrato. Primeiro, o fundo de o biofilme foi determinado sobre a superfície do poço. Posteriormente, um limiar de valor cinza que separa o biofilme do fundo do poço foi calculado com base no histograma de valor cinza de toda a imagem (GUSNANIAR et al., 2017)

A espessura média dos biofilmes foi calculada com base no número de pixels entre o fundo do biofilme (sobre a linha superior do poço) e o contorno superior do topo do mesmo. A partir destes valores, os dados referentes à espessura foram expressos em média e desvio padrão das 10 varreduras.

4.4.4.3.3.4. Tratamento e avaliação da atividade anti-biofilme

Ao final do processo de formação (48 h) a ação dos derivados vegetais (incorporados e não incorporados) sobre os biofilmes maduros foi avaliada nas concentrações de 20x, 10x, 5x

e 1x o valor da CIM obtida sobre a cepa de *C. albicans* (procedimento descrito no item 4.4.1.). Para tal, diferentes concentrações dos mesmos foram adicionadas ao meio de cultura e, logo após, placas que continham os biofilmes formados e amostras vegetais foram novamente incubadas por mais 24 h.

Ao final do período de 24h de tratamento, o conteúdo dos poços foi removido e os mesmos foram lavados com solução tampão PBS.

A atividade metabólica dos biofilmes tratados e não tratados (controle positivo de crescimento) foi determinada pelo ensaio de redução do brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio - MTT.

Foram adicionados 1 ml de solução MTT (1 mg/mL em PBS) em cada poço e as placas foram incubadas a 37 ° C durante 4 horas, protegidas de exposição à luz. Após este período, a solução de MTT foi removida de cada poço e as placas foram completamente secas para receber 1 ml de 2-propanol utilizado para dissolver o produto MTT - Formazan.

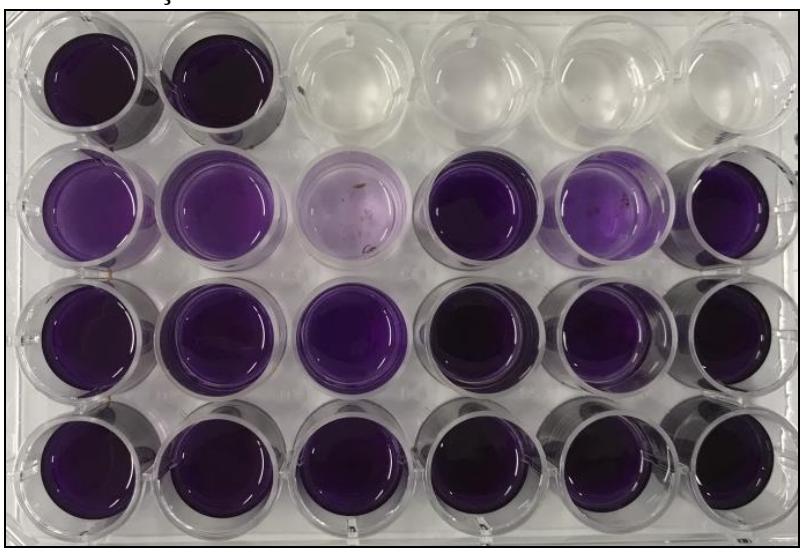
Um total de 100 uL do produto solubilizado em etanol foi transferido para poços de uma placa de 96 orifícios e a densidade óptica (DO) foi medida a 570 nm num leitor de microplacas Fluostar (BMG Labtech) (ENDO et al., 2015).

Os valores de DO foram utilizados para confecção de gráficos que expressaram porcentagem de viabilidade dos biofilmes tratados, levando-se em consideração os valores da DO dos biofilmes não tratados como 100% de viabilidade.

Assim como o XTT, o MTT é um sal de tetrazólio amplamente utilizado para mensurar a atividade metabólica de biofilmes microbianos. Seu mecanismo baseia-se na obtenção do formazam após a redução do brometo 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (amarelo) em (E,Z)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -1,3-difenilformazan (cor púrpura) pela ação das desidrogenases mitocondriais.

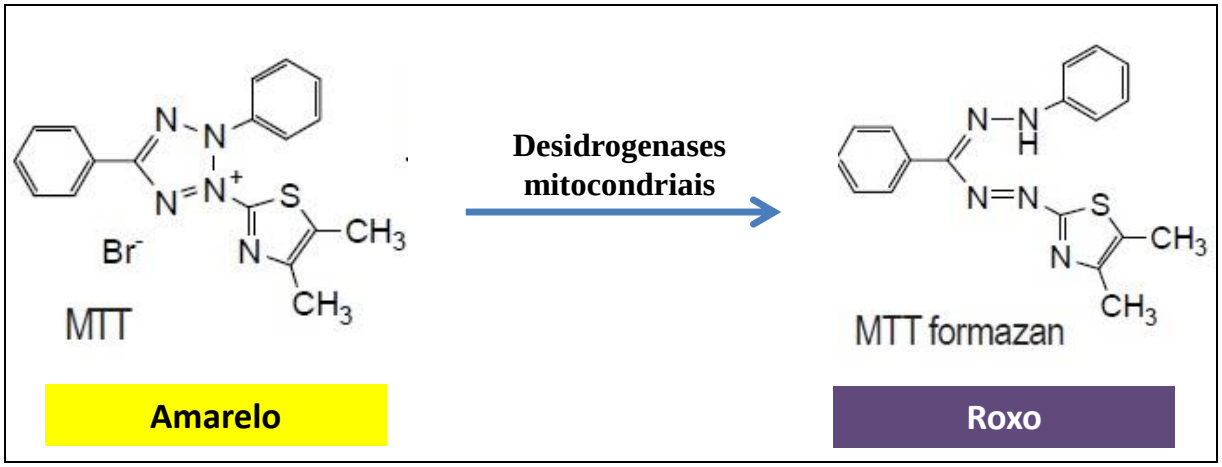
A Figura 18 representa um ensaio *in vitro* de biofilmes empregando o MTT para mensurar a atividade metabólica do mesmo e a Figura 19 apresenta a reação de redução do sal de MTT em formazam.

Figura 18. Ensaio de determinação da atividade metabólica de biofilmes utilizando o MTT



Fonte: O autor

Figura 19. Esquematização da reação de redução do sal de MTT em formazan pela acao de desidrogenases mitocondriais



Fonte: O autor

4.4.4.3.3.5. Quantificação individual da atividade sobre os biofilmes heterotípicos

A determinação da atividade individual foi determinada pela quantificação no número de unidades formadoras de colônias (UFC) resultantes após o tratamento dos biofilmes com as amostras vegetais. Este experimento foi desenvolvido afim de compreender a ação exercida sobre cada micro-organismo que compuseram os biofilmes.

Biofilmes formados e tratados como descrito anteriormente foram ressuspensos com 2 mL de solução tampão PBS por meio de agitações contínuas com auxilio de um pipetador e

ponteiras descartáveis, em seguida, as placas contendo as suspensões foram hermeticamente fechadas e submetidas à banho ultrassônico por 5 minutos para promover a desintegração dos biofilmes.

Diluições seriadas (de 10^1 até 10^8) partindo das suspensões dos biofilmes foram realizadas, e semeadas sobre a superfície de ágar (TSB ágar para os biofilmes monotípicos de *C. albicans* e MIX2; MRS ágar para os biofilmes MIX 2). As placas de ágar foram encubadas nas mesmas condições de crescimento dos biofilmes por 36 horas e ao final deste período, o número de UFC de cada micro-organismo foi contabilizado e gráficos foram expressos para mostrar a quantidade de UFC de cada micro-organismo após o tratamento, bem como o controle positivo (não tratado).

4.4.4.3.4. Análise da influencia dos tratamentos sobre a expressão genica de biofilmes maduros

Os biofilmes foram formados como descritos anteriormente. A concentração de 1x a CIM sobre as células planctônicas de *C. albicans* foi escolhida como a concentração ideal para verificar a influencia na expressão genica dos biofilmes, uma vez que esta concentração não promoveu a inibição total dos mesmos o que a torna ideal para a realização do processo de extração do material genético.

4.4.4.3.4.1. Extração e armazenamento dos biofilmes

Após 24 h em contato com os derivados vegetais, os biofilmes foram lavados duas vezes e ressuspensos dos poços utilizando 200 μL de água ultrapura livre de DNA e RNA (Sigma Aldrich ®) por pipetagem, posteriormente, foram submetidos à centrifugação (10.000 rpm / 2 min) em tubos estéreis de fungo cônico livres de DNA e RNA. O supernadande foi cuidadosamente e os pellets resultantes foram armazenados a - 80˚C.

4.4.4.3.4.2. Extração e quantificação e purificação do mRNA total

As amostras foram descongeladas lentamente em gelo e ressuspensas em 100 μL de água ultrapura livre de DNA e RNA. Após este procedimento, pequenas gotas foram despostas em nitrogênio líquido para congelamento instantâneo.

Os biofilmes congelados foram triturados com auxilio de um pistilo e um total de 350

μL de solução de lise + DTT (1: 100) foram utilizados duas vezes para promover a lise e remover a amostra.

O mRNA total foi isolado utilizando o kit de extração InviTrap® Spin cell mini kit de acordo com as instruções do fabricante e mantido imediatamente no gelo.

Após a obtenção do mRNA, as amostras foram submetidas a um tratamento para remoção do DNA por meio do kit DNA free kit da Ambion® (Life Technologies) de acordo com as instruções do fabricante.

As concentrações do mRNA total em cada amostra foram mensuradas utilizando um Nanodrop no módulo RNA.

4.4.4.3.4.3. Síntese do cDNA

O total de 500 ng de mRNA livre de DNA total foi utilizado para sintetizar o cDNA de acordo com as instruções do fabricante presentes no iScript™ Selected cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad®). A reação foi realizada em um termocilcador seguindo seguintes ciclos de temperatura: 25 ° C durante 5 minutos, 42 ° C por 30 minutos, 85 ° C durante 5 min, 4 ° C por 5 minutos, 85 ° C por 5 minutos e 4 ° C por 5 minutos. Ao final, as amostras foram retiradas do aparelho e armazenadas a - 80˚C para os experimentos de RT-PCR.

4.4.4.3.4.4. Genes estudados e primers

Neste estudo foram realizados experimentos a fim de observar a influência do tratamento realizado com os extratos vegetais sobre genes relacionados com a adesao, resistência antifúngica e biossíntese do ergosterol.

As sequências de primers utilizadas nesta investigações foram obtidas a partir de trabalhos na literatura sendo eles: o ALS3 que é um gene associado ao fenômenos de adesão de *C. albicans* (ROUDBARMOHAMMADI et al., 2016), CDR 1 e CDR 2 que são genes associados à resistência fúngica à medicamentos (ZHU; YING HUANG 2014) e o ERG 11 que é um gene associado à biossíntese de ergosterol, o principal componente da composição da membrana de *C. albicans* (FENG et al., 2016).

Para a normalização dos níveis de expressão genica foi empregado a sequencia do gene IFB-1 (HOOG et al., 2007). A Tabela 2 apresenta a sequencia de primers utilizadas nesta investigação.

Tabela 2. Sequência de primers utilizados nos experimentos de RT-PCR

Primer	Sequencia (5' – 3')	Tamanho do produto (pb)
ALS3	*Forward:* CCA AGT GTT CAA ACA ACT GAA *Reverse:* GAA CCG GTT GTT GCT ATG GT	124
CDR1	*Forward:* TGT GTA CTA TCC ATC AAC CAT CAG C *Reverse:* CAC CAA AAT AAG CCG TTC TAC CA	185
CDR2	*Forward:* TGG CAA ACA ATC CAA CAA TAC A *Reverse:* AAT CAA GGG AAT AGA TGG GTC A	126
ERG 11	*Forward:* TTG GGT GGT GGT AGA CAT A *Reverse:* GAA CTA TAA TCA GGG TCA GG	124
IFB-1	*Forward:* GCT GCT AAA GGT CCA AAA CC *Reverse:* CAT CCC ATG GTT TGA CAT CC	64

pb= pares de base

4.4.3.3.4.4. Análise quantitativa da expressão genica de *ALS3, CDR1, CDR2* e *ERG* em biofilmes tratados e não tratados

4.4.3.3.4.4.1. Preparação das amostras

As reações foram preparadas em triplicata utilizando um pipetador robótico CAS-1200™ (Corbett Life Science, Sydney, Austrália) para a deposição em placas de PCR de 384 orifícios. Em cada reação foi preparado um mix com os seguintes constituintes: iQsybrgreen supermix® (5 µL), volumes iguis (1:1) das sequencias 5' e 3' de primers (*forward* and *reverse*) (0,4 µL), cDNA (3,0 µL) e H2O (1,6 µL) totalizando um volume de 10 µL para cada amostra.

4.4.3.3.4.4.2. Reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT- PCR)

O ensaio de RT-PCR em tempo real foi realizado em uma máquina de PCR em tempo real MyCycler (Biorad, Veenendaal, Holanda) empregando o mix descrito previamente. Para tal, o seguinte programa foi usado: 95º C por 3 min, 40 ciclos de 95º C por 10 s, 55º C para o anelamento dos primers por 30 s, seguindo-se para o alongamento a 65 °C por 15 s.

Os valores de CT foram gerados por computador e o número de cópias dos genes foram determinados em relação ao número de cópias dos genes foram calculados usando os

valores de $2^{\Delta\Delta}CT$ de acordo com as considerações de Nuryastuti e colaboradores (NURYASTUTI et al., 2008). Os valores obtidos foram normalizados empregando o gene *IFB-1* como gene de referência e os dados foram expressos em gráficos que relacionam a quantificação da expressão genica em relação ao controle positivo (biofilmes não tratados).

4.4.5. Ensaios de toxicidade

Os ensaios de toxicidade foram realizados no Laboratório de Micobacteriologia, em colaboração com o Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan e a Dra. Isabel Cristiane da Silva (Departamento de Ciências Biológicas) da FCFAr.

4.4.5.1. Avaliação *in vitro* do potencial citotóxico

Nestes ensaios foram utilizadas as linhagens celulares HeLa: adenocarcinoma de colo uterino (ATCC: CCL2,), Vero: células epiteliais de rim de macaco verde africano (ATCC: CCL-81) e HaCaT: queratinócito humanos imortalizados (BCRJ:0341).

As linhagens foram mantidas em tubos criogênicos (alíquotas) na presença de soro fetal bovino (SFB) (Vitrocell®) e 5% de DMSO, sob congelamento (-80ºC) até o momento de uso. As amostras foram descongeladas e cultivadas em garrafas com superfície em torno de 12,50 cm2 contendo 10 mL de meio RPMI (Vitrocell®) enriquecido com 10% de soro fetal bovino, sulfato de gentamicina (50 mg/L) e anfotericina B (2 mg/L). As garrafas foram incubadas a 35 °C com 5% de CO2 até atingir a confluência celular. A partir deste estágio as células foram retiradas utilizando tripsina (Vitrocell®) e a concentração foi ajustada para 1x105 cels/mL.

As amostras foram avaliadas nas concentrações de 500 a 0,3 µg/mL. Adicionalmente, empregou-se o fármaco anfotericina B em todas as análises uma vez que é considerado o fármaco *gold standard* na terapia de infecções vaginais fúngicas para cepas resistentes ao fluconazol.

4.4.5.2. Avaliação da toxicidade *in vivo* sob modelo de *Artemia salina*

4.4.5.2.1. Obtenção dos cistos de *Artemia salina*

Os cistos de *Artemia salina* L**.** foram adquiridos do Rio Grande do Norte – Natal pelo produtor Flagner Soares de Souza. Os cistos são selecionados e embalados a vácuo, tendo a embalagem um peso líquido de 500g (total de cistos por grama 280.000) e a mesma é mantida a uma temperatura de 8 a 10ºC para a conservação dos cistos.

4.4.5.2.1.1. Ensaio de toxicidade em *Artemia salina*

Para determinar a toxicidade do extrato e da fração mais ativa (não incorporados e incorporados), este experimento baseou-se nas observações de Kos (2016) com modificações. No primeiro dia de experimento, a água salina artificial sofreu um pré tratamento, sendo aquecida 0,5L até 35ºC, verificou-se o pH entre 8 e 8,5, colocou-se a bomba de oxigênio e acoplou-se uma luz em cima do béquer para tentar manter a temperatura de 25ºC durante o experimento. A água salina artificial consistiu de 23 g NaCl, 11 g $MgCl_2.6H_2O$, 4 g Na_2SO_4, 1,3 g $CaCl_2.H_2O$, 0,7 g KCl e foram dissolvidos em 1000 mL de água destilada.

Após 24 horas, foram adicionados 0,5 g de cistos. No dia seguinte, os náuplios foram extraídos para o experimento. Uma suspensão de náuplios (10-15 organismos), num volume de 100 µL, foi adicionada a cada poço da microplaca de 96 poços, incluindo o grupo controle. Em uma microplaca de 96 poços separada, realizou-se a diluição seriada dos compostos em (de 500 a 1.9 µg/mL) além do controle de veículo (DMSO e sistemas nanoestruturados). As concentrações testadas foram as mesmas utilizadas no ensaio *in vitro*. Após 24 horas de incubação, a placa foi então examinada sob o microscópio estereoscópio binocular, para a contagem do número de naúplios mortos em cada poço e a concentração letal mediana (CL_{50}) foi calculada.

De acordo com FDA, a concentração letal mediana (CL_{50}) é definida como: concentração do material que os organismos são expostos que é estimado ser letal para 50% dos organismos testados. A CL_{50} é geralmente expressa como uma variável tempo-dependente (por exemplo, 24 horas CL_{50}).

4.4.6. Avaliação do potencial terapêutico da CVV em modelo experimental *in vivo* de roedores

A realização deste protocolo experimental procedeu-se após avaliação pelo Comitê de Ética do Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (CEUA/FCFAr), tendo recebido parecer favorável para a sua execução por meio do protocolo CEUA/FCF/CAr nº 48/2015 (Parecer em anexos). Ao final deste experimento, um relatório contendo a descrição dos procedimentos e resultados obtidos foi submetido ao conselho, o qual recebeu parecer favorável (Parecer em anexos).

Este experimento foi realizado no biotério do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, no qual os animais foram mantidos com temperatura e ventilação adequada, 12 horas de ciclo claro/escuro e, fez-se livre o consumo de água e alimento durante o decorrer de todo o protocolo experimental.

Os animais foram alojados em gaiolas com dimensões de 50x60x22cm forradas com maravalha esterilizada, e permaneceram durante 7 dias na sala experimental antes do início dos procedimentos para a promoção da adequação ambiental.

4.4.6.1. Delineamento experimental

O modelo experimental de infecção foi desenvolvido baseando-se no protocolo desenvolvido anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (RAMOS et al., 2016).

Foram empregadas ratas fêmeas da linhagem Wistar (*Rattus novergicus*) com 8 semanas de idade, pesando entre 200-300 g. Os animais foram providos pelo Biotério central da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP).

Com a finalidade de promover um evento de infecção vaginal semelhante ao que ocorre no ambiente vaginal da mulher, foi desenvolvido um protocolo de infecção empregando-se a cepa de *C. albicans* ATCC 10231 juntamente com a cepa de *L. acidophilus* ATCC 4356.

O tratamento principal foi realizado com a fração de *S. nitens* eleita como a mais promissora da investigação incorporada formulação F9, uma vez que a mesma apresentou bons resultados nas abordagens *in vitro*, além de apresentar perfil excelente perfil de adesividade em mucosa vaginal de suíno.

4.4.6.1.1. Estabelecimento da infecção

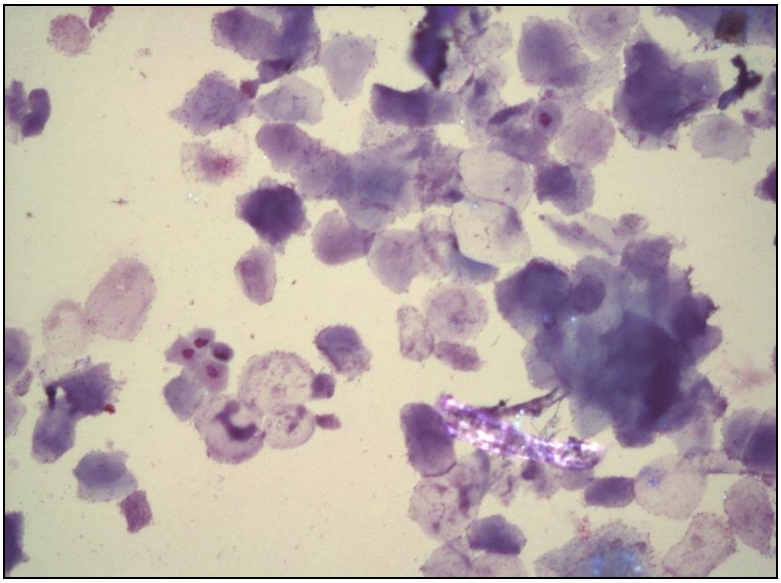
Inicialmente, os animais foram levados a um estado de imunossupressão por meio da administração de 0,3 mL de ciclofosfamida – SIGMA® (50 mg/p.c.) em dose única por via

intraperitoneal.

A indução do estado pseudo-estro foi obtida pela através da indução hormonal com cipionato de estradiol (20 mg/mL) por meio de administrações diárias por via subcutânea (0,1 mL). O estado hormonal pretendido foi verificado através de análises microscópicas da morfologia celular encontrada no fluido vaginal dos animais, obtido através da lavagem com 0,5 mL de solução PBS tamponada estéril, onde a predominância de células epiteliais cornificadas e anucleadas indicaram a fase estral pseudo-estro (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002).

A Figura 20 apresenta uma imagem obtida por microscopia óptica (40x) das células epiteliais (coradas por coloração de Giemsa) obtidas de um lavado vaginal de ratas induzidas a um estado de pseudo-estro com empregando-se o cipionato de estradiol como agente indutor.

Figura 20. Fotomicrografia de células epiteliais vaginais de ratas induzido ao estado pseudo-estro com a utilização de cipionato de estradiol observadas por microscopia óptica em aumento de 40X



Fonte: O autor

Após o a adequação do ciclo estral dos animais de cada grupo específico e confirmação da indução do estado por um período de 5 dias, procedeu-se a infecção intravaginal com uma suspensão contendo $5.0x10^8$ células/mL de *C. albicans e* $1x10^7$ células/mL de *L. acidophilus* preparada em solução PBS tamponada estéril através da injeção de 0,1mL do inoculo misto.

Para verificação da infecção, após dois dias da inoculação foram realizadas lavagens

vaginais com 0,5 mL de solução tamponada de PBS estéril, submetidas a análise microscópica e cultivadas em Ágar Sabouraud Dextrose acrescido de cloranfenicol (ASD+clo). As placas foram incubadas a 37º C durante 48 horas. A presença de células leveduriformes livres ou em brotamento observadas sob microscopia óptica e o crescimento de unidades formadoras de colônias (UFC) no meio de cultura foi considerado positivo para a infecção.

4.4.6.1.2. Grupos experimentais e tratamento terapêutico

Foram empregados 9 grupos experimentais constituídos de 8 animais (n=72) em cada. A Tabela 3 apresenta os grupos experimentais e seus respectivos parâmetros de tratamentos estabelecidos.

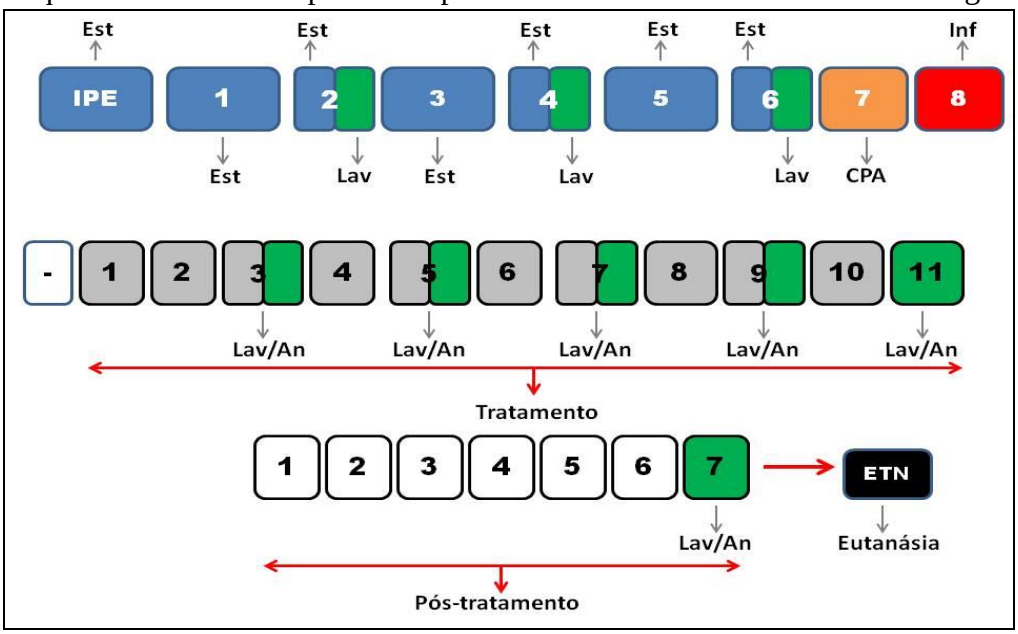
Tabela 3. Grupos experimentais e tratamentos do ensaio *in vivo*.

Grupo experimental	Especificação	Tratamento
Grupo 1*	Controle negativo de infecção	Solução de PBS estéril
Grupo 2*	Controle de infeção1	Solução de PBS estéril
Grupo 3**	Controle de infecção 2	Solução de PBS estéril
Grupo 4***	Controle de infecção 3	Solução de PBS estéril
Grupo 5***	Controle com creme vaginal	0,1 mL de creme vaginal (anfotericina B+ tetraciclina)
Grupo 6***	Controle do Solvente	0,1 mL do solvente utilizado para solubilizar a fração
Grupo 7***	Tratamento 1	0,1 mL da fração não incorporarada (2,0 mg/ml)
Grupo 8***	Controle da Microemulsão	0,1 mL da NE sem a fração
Grupo 9***	Tratamento 2	0,1 mL da NE com a fração incorporada (2,0 mg/ml)

** C. albicans; ** Lactobacillus* sp.*; *** C.albicans + Lactobacillus* sp.

A Figura 21 apresenta um esquema deste experimento apresentando as etapas referentes a todos os processos descritos.

Figura 21. Esquema do ensaio terapêutico experimental *in vivo* de candidíase vulvovaginal



IPE= indução do estado pseudo-estro; Est = estradiol; CPA = ciclofosfamida; Inf = infecção; Lav = lavagem; Lav/An = lavagem+análise

Fonte: Bauab, 2017.

Os tratamentos empregados nos ensaios foram realizados duas vezes ao dia durante 10 dias. O grupo 5, o qual foi empregado como um controle com antifúngico comercial, foi tratado com creme vaginal a base de cloridrato de tetraciclina (25 mg/g) + anfotericina B (12,5 mg/g) (EMS® São Paulo, Brasil). Os grupos 7 e 9 foram tratados com a fração não incorporada e incorporada respectivamente. Os grupos 6 e 8 foram constituídos dos veículos/solventes utilizados para a administração do derivado vegetal.

Todos os animais foram submetidos a pesagem diária durante o período de tratamento, os valores encontrados foram comparados àqueles pertencentes ao grupo controle negativo de infecção (não infectados - Grupo 1). Estes dados permitiram observar fatores como a desnutrição e/ou obesidade que por ventura foram ocasionados pela administração do extrato ou ao estabelecimento do estado patológico.

4.4.6.1.3. Análise da eficácia do tratamento

Nos dias 2, 4, 6, 8 e 10 do período de tratamento (realizado duas vezes ao dia), os animais foram submetidos à coleta dos fluidos vaginais e foram realizadas análises

microscópicas afim de verificar a presença ou ausência de leveduras e bactérias no ambiente vaginal e, também será realizada a semeadura do mesmo em ASD+clo e AMH+anfo, e incubação a 37ºC por 48 horas, para que fosse possível quantificar o número de UFC em cada dia da análise do tratamento.

4.4.6.1.4. Análise da recidiva de infecção e eutanásia

Após os 10 dias do término do período de tratamento, os animais foram submetidos ao controle de recidiva da infecção afim de identificar e diagnosticar posteriores estados infecciosos. Para este fim, foram procedidas análises microscópicas e culturas dos fluidos vaginais coletados diariamente da mesma maneira que foram coletados e analisados durante o período de análise da eficácia do tratamento por um período de 7 dias.

Ao final desta etapa os animais foram eutanasiados em câmara de CO_2.

5. RESULTADOS

5.1. Fracionamento do extrato metanólico de *s. nitens*

As frações foram concentradas em evaporador rotativo e, em seguida, secas sob fluxo de ar em capela e mantidas em dessecador com sílica gel sob pressão reduzida. A Tabela 4 apresenta os rendimentos das frações obtidas neste fracionamento.

Tabela 4. Rendimentos das frações do extrato metanólico de *S. nitens* obtidas por EFS.

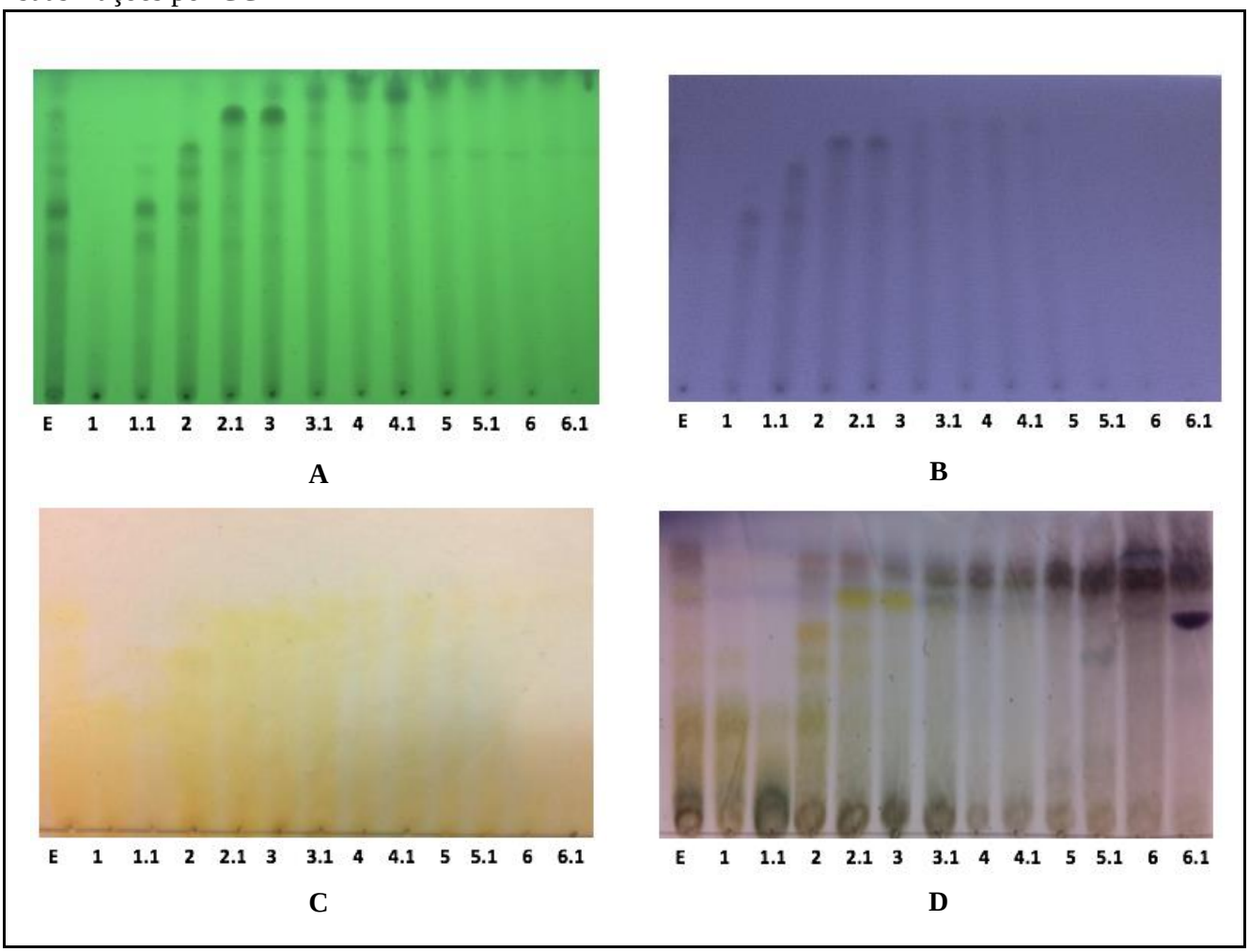
Fração	Fase móvel (v/v)	Massa (g)	Rendimento (%)
Fr 1	metanol: água (50:50)	1,842	38,7
Fr 1.1	metanol: água (50:50)	1,623	34,1
Fr 2	metanol: água (60:40)	0,2203	4,63
Fr 2.1	metanol: água (60:40)	0,1525	3,21
Fr 3	metanol: água (70:30)	0,1565	3,29
Fr 3.1	metanol: água (70:30)	0,0944	1,99
Fr 4	metanol: água (80:20)	0,0423	0,89
Fr 4.1	metanol: água (80:20)	0,0152	0,33
Fr 5	metanol: água (90:10)	0,0237	0,52
Fr 5.1	metanol: água (90:10)	0,0376	0,82
Fr 6	metanol (100)	0,0563	1,18
Fr 6.1	metanol (100)	0,4943	10,34
Total		4,7581	

Nota-se que o procedimento de EFS teve um bom rendimento total das frações, o que corresponde a aproximadamente 95% da massa inicial do extrato metanólico utilizado. O mesmo comportamento foi mantido quando foi realizado o fracionamento em maior escala.

5.1.1. Análise das frações de *S. nitens* por cromatografia em camada delgada

De acordo com os experimentos realizados, foi verificado que a FM5 composta por clorofórmio + metanol + água (43:37:20) proporcionou maior resolução cromatográfica para as amostras analisadas. A Figura 22 apresenta as cromatoplacas obtidas com o extrato metanólico (E) e as frações.

Figura 22. Cromatoplacas apresentando as análises cromatográficas do extrato de *S. nitens* e suas frações por CCD



revelação: UV λ= 254 (A), UV λ= 365 (B), revelador seletivo para flavonoides – NP-PEG (C) e solução de anisaldeído sulfúrico (D). E= extrato metanólico; 1-6.1= frações.

Fonte: Autor

As placas da CCD foram reveladas sob luz UV em 254 (comprimento de onda curto) e 365nm (comprimento de onda longo), sendo possível observar absorção de luz UV em ambos os comprimentos de onda analisados. As revelações com o revelador universal anisaldeído sulfúrico mostrou que as amostras analisadas apresentaram perfis cromatográficos distintos, entre as frações obtidas, a Fr3 apresentou o melhor perfil de separação, com uma mancha isolada de coloração amarela, dando indício da presença de flavonoides.

A revelação com o NP-PEG evidenciou a presença de flavonoides, uma vez que houve predominância da coloração amarela na maioria das amostras, com exceção apenas para a Fr 6.1.

5.1.2. Análise biomonitorada das frações e do extrato metanólico de escapos de *S. nitens*

A Tabela 5 apresenta os valores de CIM desempenhados pelas amostras analisadas frente às cepas empregadas nesta investigação.

Tabela 5. Resultados da atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *S. nitens* e suas frações sobre cepas de *C. albicans* e *L. acidophilus*

	CIM[a]			
Amostra	*C. albicans* ATCC 10231	*C. albicans* CAV3	*C. albicans* CAS1	*L. acidophilus* ATCC 4356
ESN	250	1000	500	>1000
Fr1	>1000	>1000	>1000	>1000
Fr1.1	>1000	>1000	>1000	1000
Fr2	250	250	250	1000
Fr2.1	250	125	125	500
Fr3	62,5	125	62,5	500
Fr3.1	125	250	125	62,5
Fr4	250	250	250	1000
Fr4.1	500	500	250	1000
Fr5	250	500	250	1000
Fr5.1	250	500	500	1000
Fr6	>1000	>1000	1000	>1000
Fr6.1	>1000	>1000	>1000	>1000
ANB	4,0	2,5	2,5	-
AMP	-	-	-	0,3
DMSO	-	-	-	-

[a]valores em µg/mL; ANB= anfotericina B; AMP= ampicilina; DMSO= dimetilsulfóxido 5%; ESN= extrato de *S. nitens*

Por meio do fracionamento realizado foi possível obter 12 frações constituídas por diferentes constituintes. A diferença composicional presente em cada uma das amostras obtidas refletiu diretamente na ação antimicrobiana das mesmas. Nota-se que além do extrato, oito frações foram ativas contra as cepas empregadas no estudo, entretanto, destacam-se os resultados desempenhados pela fração Fr3.

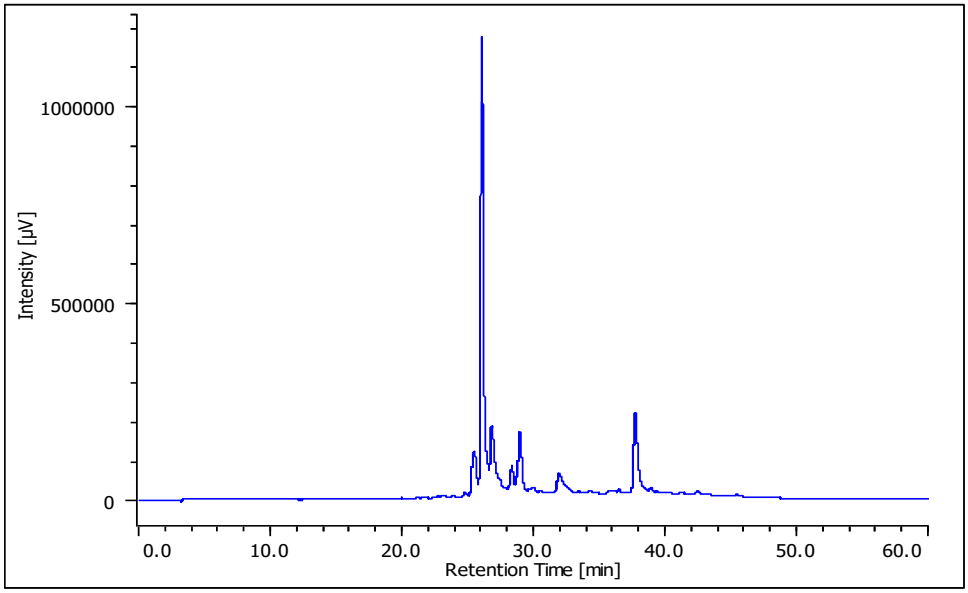
Neste sentido esta fração foi eleita como a mais promissora da investigação, a qual foi

empregada nos estudos envolvendo as analises biológicas e aprofundamento do estudo de caracterização química.

5.1.3. Análise por CLAE-DAD do extrato metanólico e suas frações

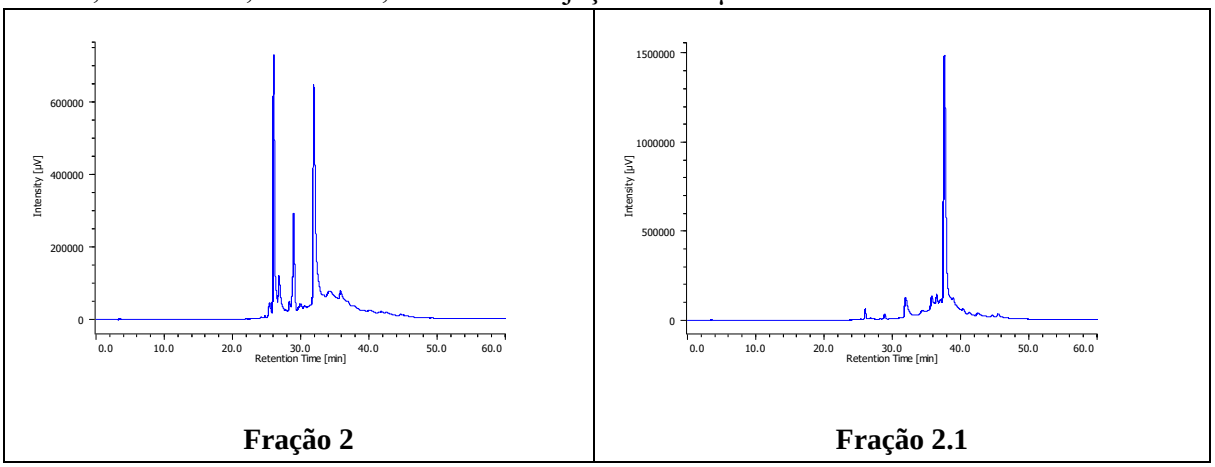
Seguem os cromatogramas obtidos pelas análises por CLAE-DAD: extrato metanólico (Figura 23), Fr2 e Fr2.1 (Figura 24), Fr3 e Fr3.1 (Figura 25), Fr4 e Fr 4.1 (Figura 26) Fr5 e Fr 5.1 (Figura 27). O comprimento de onda selecionado para a apresentação dos cromatogramas foi o de 350 nm, uma vez que foi a leitura mais satisfatória apresentando maior número de picos e maior absorbância das substâncias dentre os quatro comprimentos de onda analisados.

Figura 23. Cromatograma (CLAE-DAD) do extrato metanólico de *S. nitens* no comprimento de onda de 350 nm. Condições cromatográficas: coluna Thermo Hypersil Gold aQ® C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm); fase móvel em modo gradiente - 5-100% de metanol por 50 min, seguido de metanol por 10 min; vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção de 20 µL



Fonte: Autor

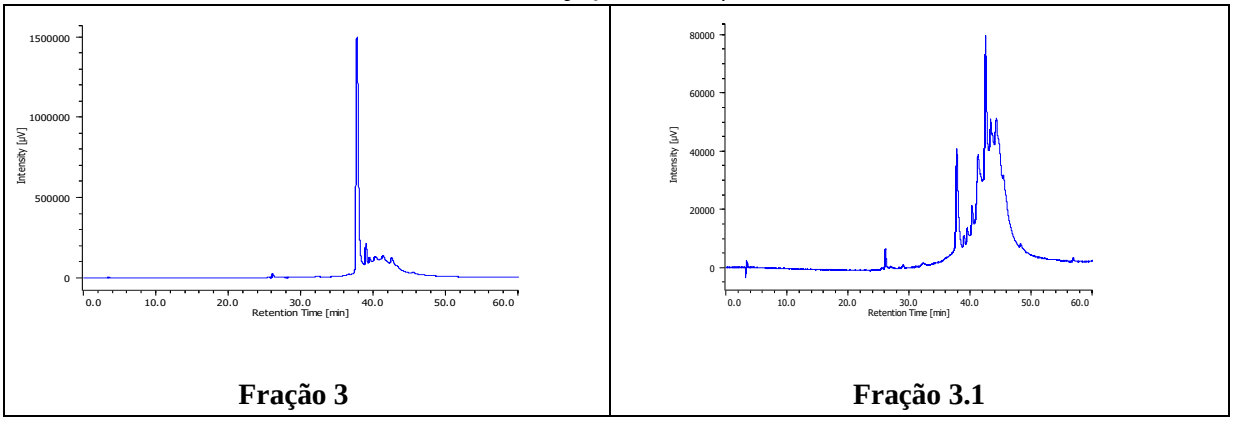
Figura 24. Cromatograma (CLAE-DAD) das frações 2 e 2.1 no comprimento de onda de 350 nm. Condições cromatográficas: coluna Thermo Hypersil Gold aQ® C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm); fase móvel em modo gradiente - 5-100% de metanol por 50 min, seguido de metanol por 10 min; vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção de 20 µL



Fração 2 **Fração 2.1**

Fonte: O autor

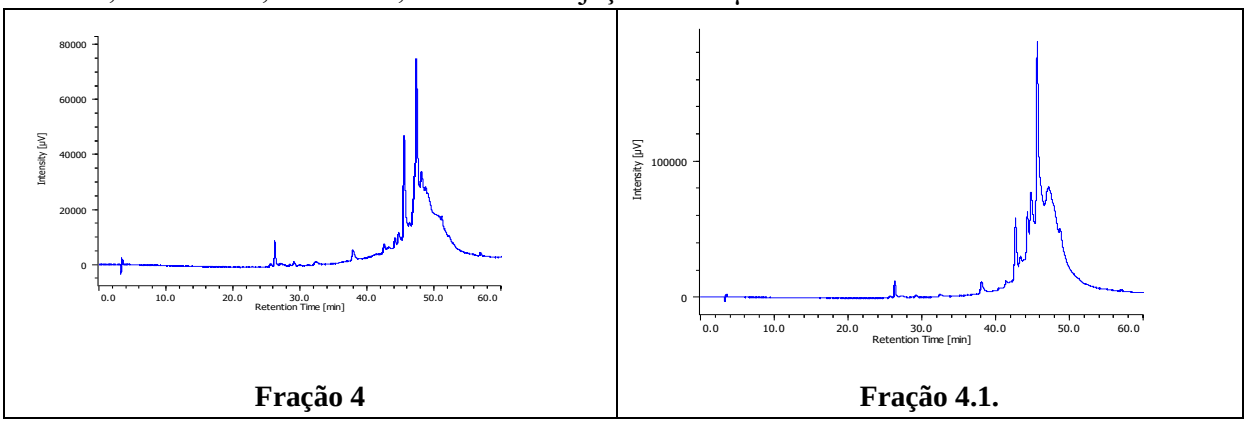
Figura 25. Cromatograma (CLAE-DAD) das frações 3 e 3.1 no comprimento de onda de 350 nm. Condições cromatográficas: coluna Thermo Hypersil Gold aQ® C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm); fase móvel em modo gradiente - 5-100% de metanol por 50 min, seguido de metanol por 10 min; vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção de 20 µL



Fração 3 **Fração 3.1**

Fonte: O autor

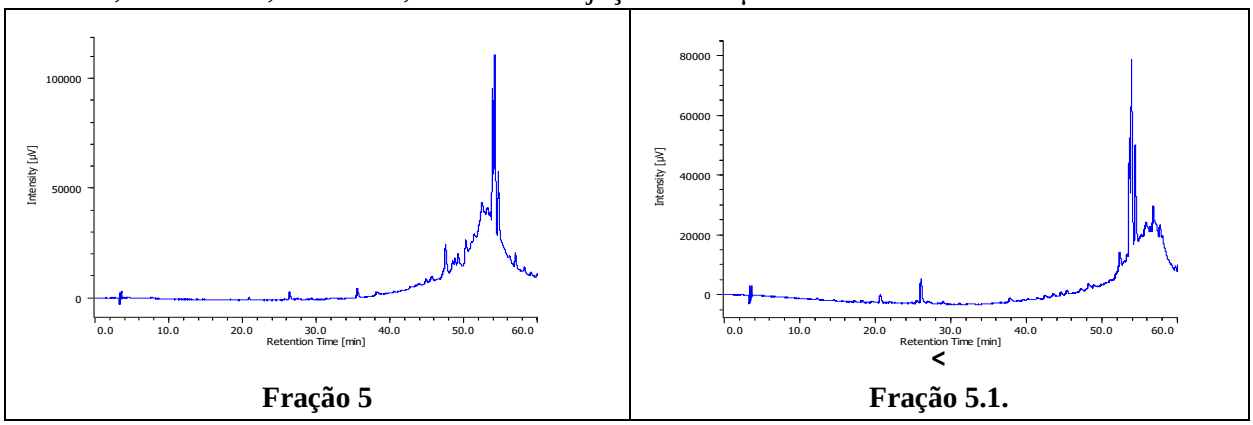
Figura 26. Cromatograma (CLAE-DAD) das frações 4 e 4.1 no comprimento de onda de 350 nm. Condições cromatográficas: coluna Thermo Hypersil Gold aQ® C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm); fase móvel em modo gradiente - 5-100% de metanol por 50 min, seguido de metanol por 10 min; vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção de 20 µL



Fração 4 **Fração 4.1.**

Fonte: O autor

Figura 27. Cromatograma (CLAE-DAD) das frações 5 e 5.1 no comprimento de onda de 350 nm. Condições cromatográficas: coluna Thermo Hypersil Gold aQ® C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm); fase móvel em modo gradiente - 5-100% de metanol por 50 min, seguido de metanol por 10 min; vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção de 20 µL



Fração 5 **Fração 5.1.**

Fonte: O autor

A análise dos cromatogramas obtidos confirmou que todas as frações ativas possuem perfis cromatográficos distintos, especialmente em termos quantitativos, o que confirma os resultados apresentados na análise por CCD. Estas diferenças de perfis estão diretamente relacionadas com o resultado das análises encontradas na determinação da CIM frente às cepas fúngicas e a cepa bacteriana, uma vez que se obteve padrões inibitórios distintos.

5.1.4. Análise química da fração ativa eleita como a mais promissora da investigação (Fr3) e do extrato metanólico

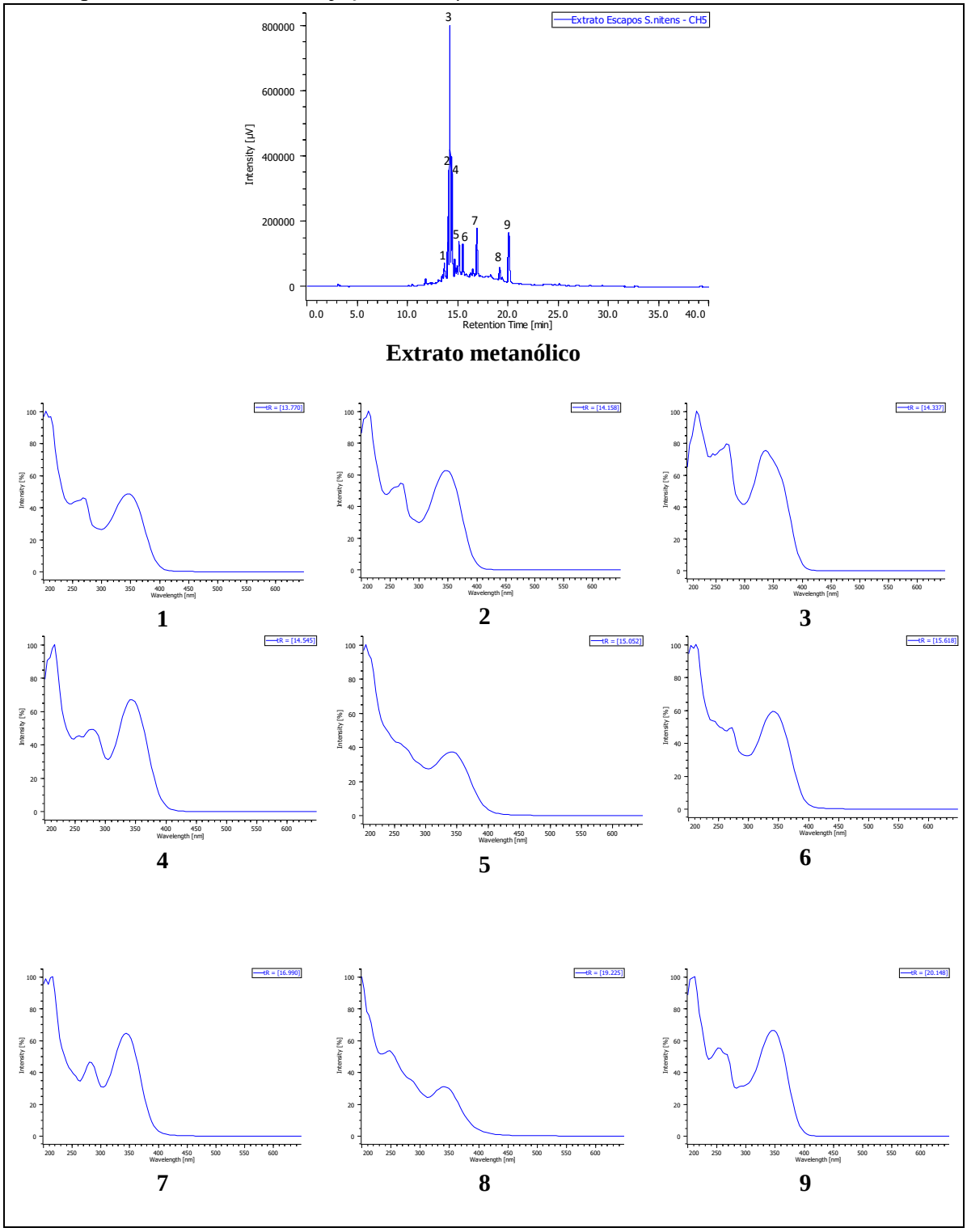
Tendo em vista a superioridade da atividade antifúngica apresentada, a Fração 3 (Fr3) foi a fração eleita como a mais promissora no desempenho da atividade antimicrobiana, sendo assim, esta amostra vegetal foi empregada para dar continuidade aos ensaios biológicos seguintes deste projeto de pesquisa.

O método desenvolvido por Pacífico et al. (2011) possibilitou uma análise mais profunda dos constituintes da fração Fr3 e auxiliou na avaliação.

O cromatograma por CLAE-DAD do extrato metanólico dos escapos de *S. nitens* (Figura 28) evidenciou picos majoritários com T_R na faixa de 12 a 21 min.

Estas modificações forneceram uma base sólida para que possíveis constituintes fossem elucidados , uma vez que a metodologia desenvolvida e padronizada por Pacífico et al. (2011) caracterizou 17 compostos no extrato metanólico de *S. nitens.*

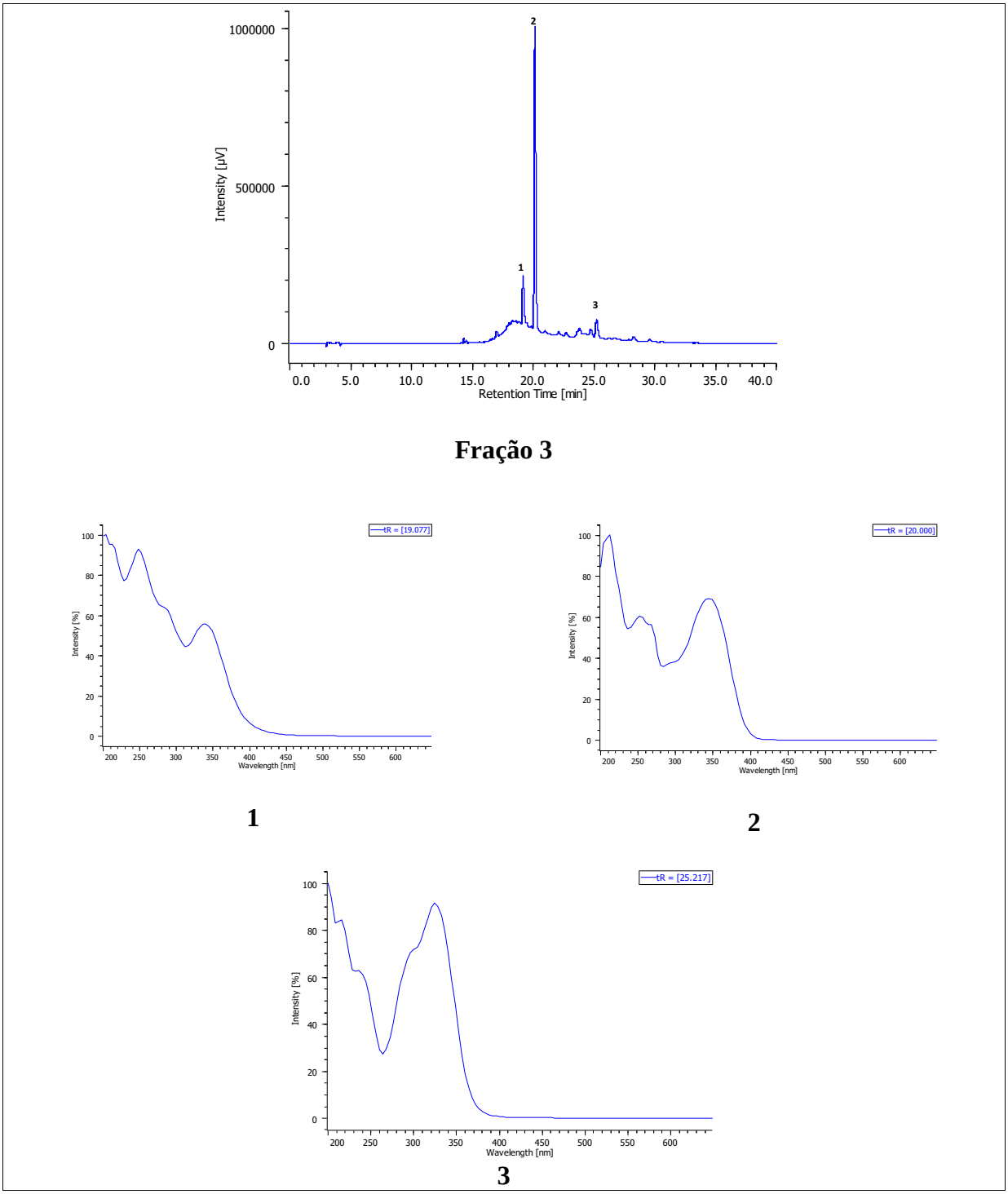
Figura 28. Cromatograma (CLAE-DAD) do extrato metanólico dos escapos de *S. nitens* no comprimento de onda de 280 nm. Condições cromatográficas: coluna Luna C18(2) Phenomenex® (250 x 4,6 mm; 5 µm); fase móvel em gradiente 5% B por 3 min, 5-38% B por 11 min, 38% B por 3 min, 38-42% B por 8 min (modo gradiente) 42% B por 10 min; a partir de 47% B por 5 min; volume de injeção de 20 µL



Fonte: O autor

Seguindo o mesmo método, a Fr3 também foi analisada. A Figura 29 apresenta o cromatograma desta fração, bem como o espectro de absorção no UV dos picos de interesse.

Figura 29. Cromatograma (CLAE-DAD) de Fr3 no comprimento de onda de 280 nm. Condições cromatográficas: coluna Luna C18(2) Phenomenex® (250 x 4,6 mm; 5 µm); fase móvel em gradiente 5% B por 3 min, 5-38% B por 11 min, 38% B por 3 min, 38-42% B por 8 min (modo gradiente) 42% B por 10 min; a partir de 47% B por 5 min; volume de injeção de 20 µL



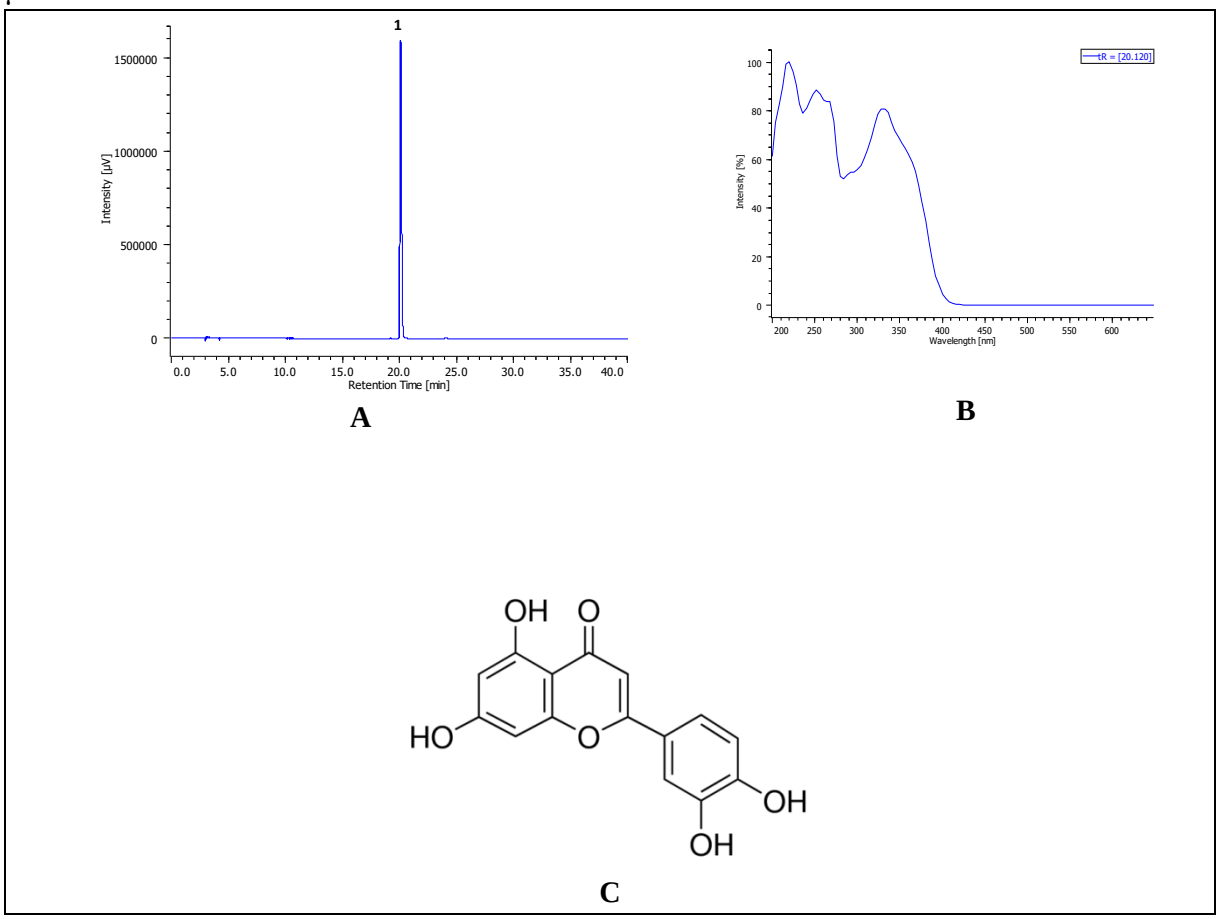
Fonte: O autor

Os dados contidos na Figura 29 mostram que a Fr3 apresenta apenas 3 picos principais, sendo o majoritário o pico 2 (t_R= 20,00 min).

A análise do perfil cromatográfico por CLAE-DAD da Fr3 quando comparado com o perfil cromatográfico do extrato metanólico dos escapos de *S. nitens* por Pacifico et al. (2011) corroborou também com a presença da luteolina e de seus derivados na referida Fr3.

Para dar continuidade a este estudo, foi empregado o padrão luteolina (3',4',5,7-tetraidroxiflavona) Sigma® (pureza ≥ 98%) e analisado pelo mesmo método cromatográfico ao qual a Fr3 foi submetida. A Figura 30 apresenta o cromatograma da luteolina (A), o espectro de absorção no ultravioleta do pico evidenciado (B) bem como a estrutura química desta substância (C).

Figura 30. Cromatograma do padrão luteolina no comprimento de onda de 280 nm. Condições cromatográficas: coluna Luna C18(2) Phenomenex® (250 x 4,6 mm; 5 µm); fase móvel em gradiente 5% B por 3 min, 5-38% B por 11 min, 38% B por 3 min, 38-42% B por 8 min (modo gradiente) 42% B por 10 min; a partir de 47% B por 5 min; volume de injeção de 20 µL.

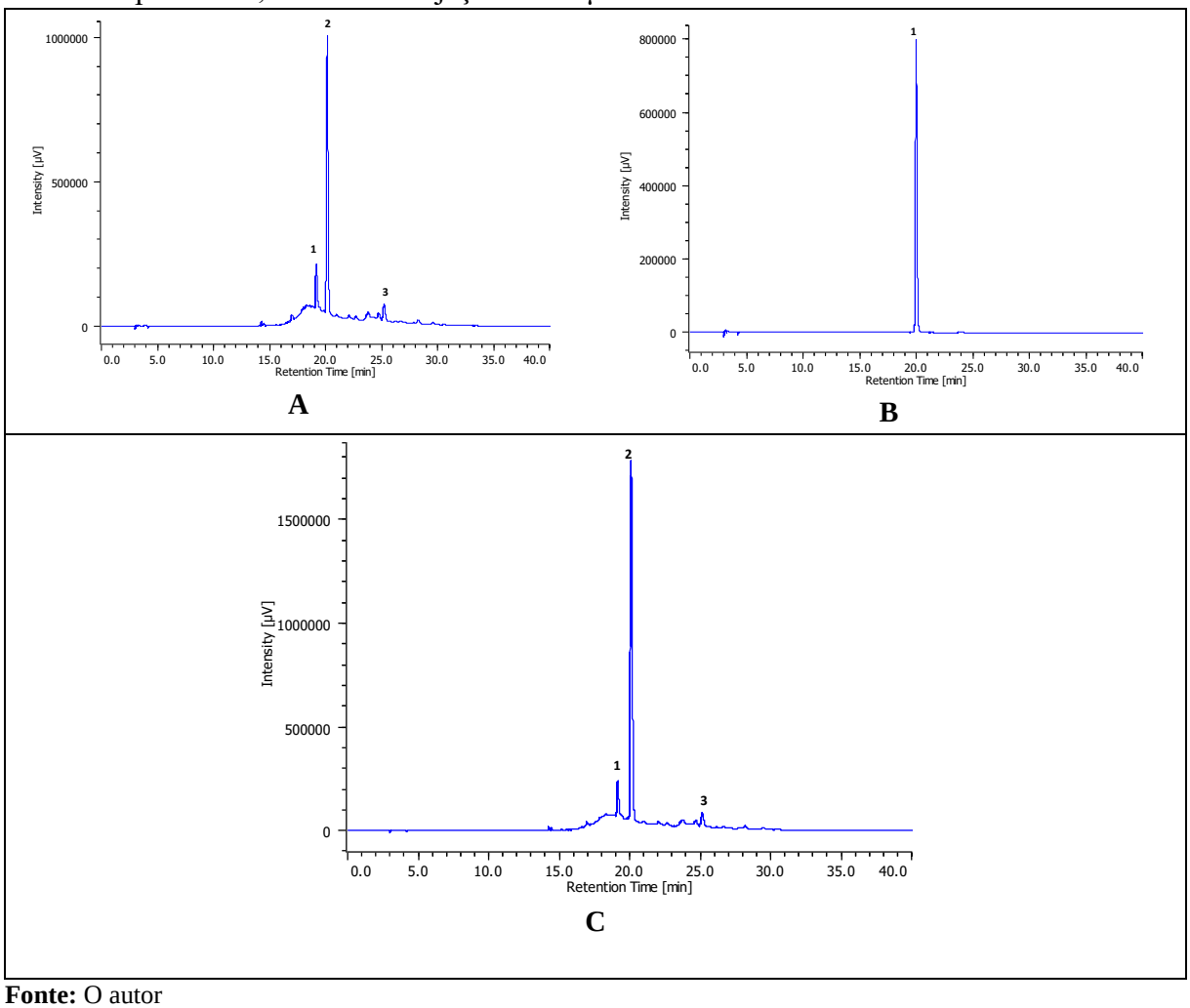


Fonte: O autor

Nota-se que o composto avaliado apresentou espectro no ultravioleta com bandas nos comprimentos de onda de 250 e 350 nm, característicos da luteolina. Adicionalmente, nota-se que a detecção do pico no cromatograma da Figura 29 deu-se no mesmo t_R do pico 2 (20.00 min) da Fr3 (Figura 25), evidenciando tratar-se da mesma substância, com mesmo espectro no UV.

Para confirmar que se tratava da mesma substância presente no pico 2 da Fr 3, foram realizadas novas análises confirmatórias. Para tal, a Fr3 (A) e a luteolina (B) foram adequadamente diluídas (1:1 em MeOH), analisadas separadamente e co-injetadas (C). A Figura 31 apresenta os resultados deste ensaio.

Figura 31. Cromatograma CLAE-DAD (A = Fr 3; B = Luteolina; C= Fr 3 + luteolina) no comprimento de onda de 280 nm. Condições cromatográficas: coluna Luna C18(2) Phenomenex® (250 x 4,6 mm; 5 µm); fase móvel em gradiente 5% B por 3 min, 5-38% B por 11 min, 38% B por 3 min, 38-42% B por 8 min (modo gradiente) 42% B por 10 min; a partir de 47% B por 5 min; volume de injeção de 20 µL



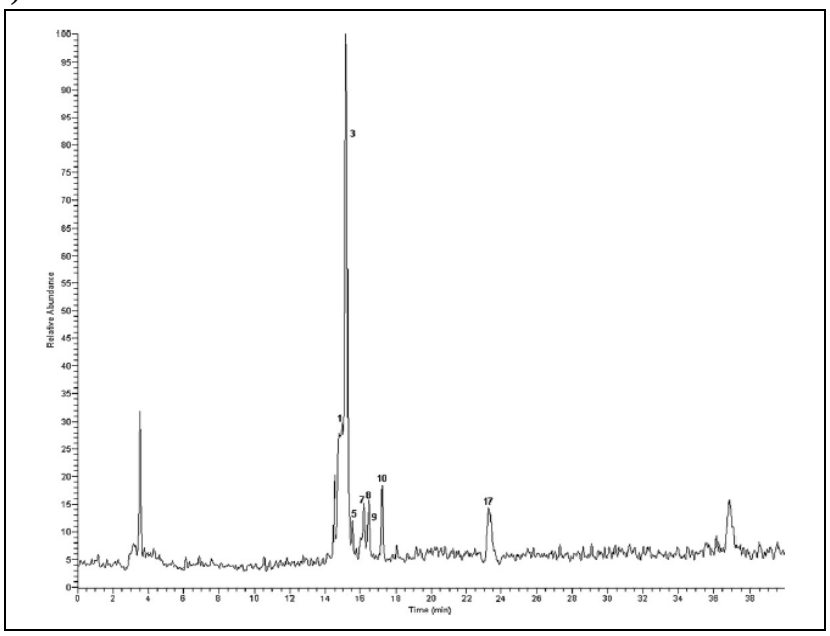
Fonte: O autor

Com este ensaio foi possível confirmar que o pico majoritário (2) presente na Fr3 é o flavonóide luteolina (3',4',5,7-tetraidroxiflavona), uma vez que após a co-injeção das duas amostras (Fr3 e padrão luteolina) houve aumento da intensidade do pico correspondente à luteolina em Fr3 (Figura 31, C).

Estes resultados corroboram as considerações feitas por Pacífico et al. (2011) que identificou a luteolina somente no extrato metanólico dos escapos de *S. nitens*.

A Figura 32 apresenta o cromatograma do extrato metanólico de escapos de *S. nitens* obtido no estudo de Pacífico et al. (2011), no qual é possível encontrar o pico correspondente a luteolina (17) identificado no extrato metanólico dos escapos da planta.

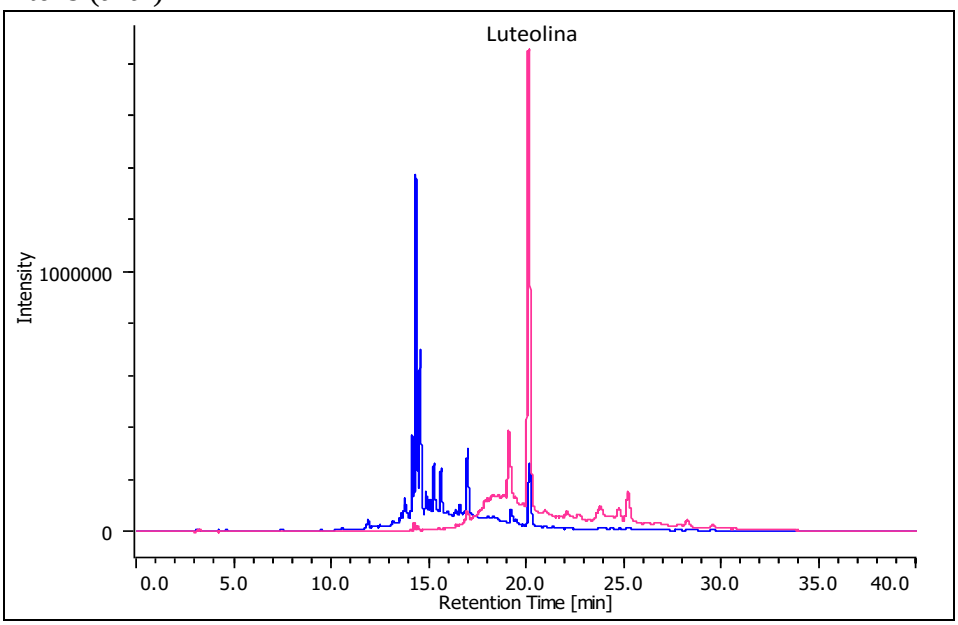
Figura 32. Cromatograma do extrato metanólico de escapos de *S. nitens* realizado por Pacífico et al. (2011)



Fonte: Pacífico et al., 2011

Tendo em vista estes resultados, pode-se concluir que a superioridade de ação exercida pela Fr3 em relação ao extrato metanólico de *S. nitens* está diretamente relacionada com concentração de luteolina em sua composição, uma vez que o fracionamento realizado possibilitou a concentração deste composto na Fr3. A Figura 33 apresenta a sobreposição dos cromatogramas do extrato (azul) e Fr3 (rosa) confirmando esta afirmação.

Figura 33. Sobreposição dos cromatogramas da fração Fr3 (rosa) e do extrato metanólico dos escapos de *S. nitens* (azul)



Fonte: O autor

5.1.5. Análise antimicrobiana da luteolina pura

Após confirmação de que a luteolina é o composto majoritário da Fr3, procedeu-se uma avaliação do potencial antimicrobiano deste composto sobre as mesmas cepas estudadas e nas mesmas condições anteriormente realizados (descrição no item 4.2.3).

A Tabela 6 apresenta os valores de CIM , CFM e CBM exercido pela luteolina sobre as cepas estudadas.

Tabela 6. Resultados do potencial inibitório da luteolina pura sobre cepas de *C. albicans* e *L. acidophilus*

Amostra	***C. albicans* *ATCC 10231***	***C. albicans* CAV3**	***C. albicans* CAS1**	***L. acidophilus* ATCC 4356**
	***CIM/CFM**	***CIM/CFM**	***CIM/CFM**	***CIM/CBM**
Luteolina	50/100	50/100	100/100	200/>200
ANB	4,0	2,5	2,5	-
AMP	-	-	-	0,3
Solvente	-	-	-	-

[a]valores em µg/mL; ANB= anfotericina B; AMP= ampicilina; CIM= concentração inibitória mínima; CBM= concentração bactericida mínima; CFM= concentração fungicida mínima.

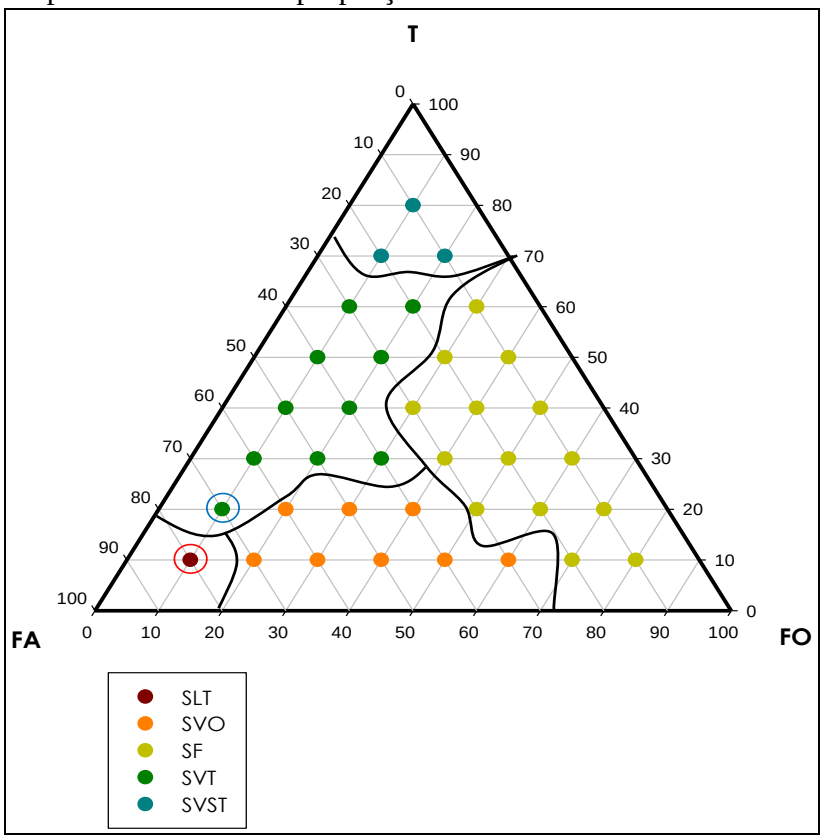
Os resultados obtidos demonstram que a luteolina foi ativa contra todas as cepas empregadas na investigação apresentando valores de CIM promissores sobre todas os micro-organismos. Tendo em vista este resultados, pode-se confirmar que atividade antimicrobiana apresentada pela Fr3 é devido à presença da luteolina em sua constituição.

5.2. Desenvolvimento do sistema lipídico nanoestruturado (SLN)

5.2.1. Diagrama de fases ternário

O diagrama de fases obtido (Figura 34) representa cada uma das formulações desenvolvidas e suas classificações visuais: sistema líquido transparente (SLT), sistema viscoso opaco (SVO), sistema viscoso transparente (SVT), sistema viscoso semitransparente (SVST) e separação de fases (SF). Nota-se que desse modo, foi possível delimitar as diferentes regiões no diagrama de fases.

Figura 34. Digrama de fases ternário segundo características visuais observadas em cada formulação obtida a partir de diferentes proporções dos constituintes do SLN



FA= Fase aquosa, FO= fase oleosa, T= tensotivo
Fonte: O autor

5.2.1.1. Escolha das formulações para análises farmacotécnicas e biológicas

A partir da análise feita por meio do diagrama de fases foram eleitas duas formulações para a realização das análises de caracterização estrutural e biológicas, as quais são expostas na Tabela 7.

Tabela 7. Características e composição das formulações escolhidas

Formulação	Fase aquosa	Fase oleosa	Tensoativo	Classificação
F1	80%	10%	10%	SLT*
F9	70%	10%	20%	SVT**

*sistema líquido transparente, **sistema viscoso transparente

A formulação F1 (circulada em vermelho) foi escolhida por ter se apresentado como a mais líquida e transparente do diagrama de fases, sendo assim, a utilização da mesma na realização das análises biológicas *in vitro* mostra-se ideal. Já a formulação F9 (circulada em azul) mostrou-se diferente, sendo inclusive classificada em outra região do diagrama, todavia, tenha se mostrado viscosa, também apresentou estabilidade e transparência. Esta viscosidade torna-se interessante para administração em mucosas e nas análises de inibição de biofilmes *in vitro*, pois garante uma maior adesividade no local de aplicação, sendo assim nos propomos a analisar também o comportamento desta formulação nas análises *in vitro* e principalmente no ensaio terapêutico *in vivo* de candidíase vulvovaginal.

5.3. Ensaios farmacotécnicos e caracterização das formulações escolhidas

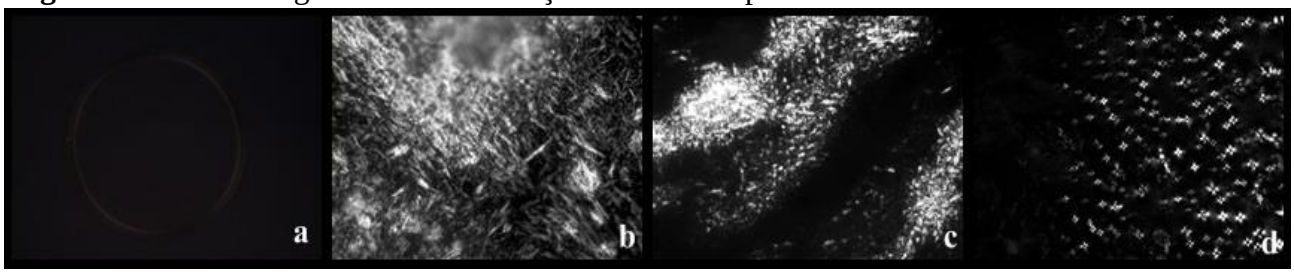
Para a realização das análises farmacotécnicas, o extrato vegetal foi incorporado na concentração de 2000 µg/mL nas formulações F1 e F9, originando assim as formulações F1 I e F9 I.

Optou-se por realizar as análises farmacotécnicas dos sistemas com a incorporação do extrato vegetal uma vez que contávamos com quantidade superior de massa em relação às frações, em especial a Fr3 o que viabilizou o desenvolvimento de todas as análises. Esta escolha é plausível, uma vez que o extrato confere todas as características das frações obtidas, inclusive a Fr3, além de ambos os compostos terem as mesmas características de solubilidade.

5.3.1. Microscopia de luz polarizada (MLP)

A Figura 35 Apresenta as imagens das formulações (F1, F1 I, F9 e F9 I) analisadas por MLP.

Figura 35. Fotomicrografias das formulações analisadas por MLP sob aumento de 20X



a= F1, b= F1I= c= F9, d= F9I
Fonte: O autor

De acordo com os dados obtidos por MLP pode-se constatar que as formulações apresentam características anisotrópicas distintas. A formulação F1 apresentou campo escuro, sendo assim não foi capaz de desviar o plano de luz incidido o que é compatível com a característica líquida transparente da formulação indicando ser um sistema líquido nanoemulsionado, todavia, a incorporação do extrato vegetal (F1 I) garantiu à formulação a capacidade de desviar o plano de luz emitido, estruturas cristalinas com características de estrias foram observadas, o que indica que o derivado vegetal conferiu ao sistema uma conformação mais estruturada a qual se mostra condizente com a característica viscosa transparente que o sistema obteve após a incorporação.

Na formulação F9 que se mostrou como um sistema viscoso transparente foram observadas estruturas estriadas o que mostra que o sistema está mais estruturado, adicionalmente, a incorporação do derivado vegetal à formulação (F9 I) garantiu uma maior estruturação da mesma uma vez que foram evidenciadas estruturas que conferem uma maior estruturação ao sistema, sendo elas estrias e cruz de malta.

5.3.2. Dispersão de luz dinâmica e ensaio de estabilidade

A Tabela 8 apresenta os valores das médias e desvio-padrão dos tamanhos das gotículas e o IPD para as formulações incorporadas e não incorporadas. O IPD mede a homogeneidade entre a média dos tamanhos das partículas em relação ao desvio-padrão, onde

quanto menor o IPD, maior a uniformidade apresentada pelas partículas (GOYAL et al., 2012). A fim de avaliar o grau de estabilidade desse sistema, a análise foi realizada 24 horas após o preparo das formulações e incorporação do derivado vegetal (tempo 0), bem como após o período de três meses (tempo 3).

A Tabela 8 apresenta os dados obtidos referentes ao tamanho das partículas do sistema e o índice do polidispersão, bem como a análise de estabilidade das formulações.

Tabela 8. Valores das médias e desvio-padrão dos diâmetros das gotículas e IPD para a as formulações desenvolvidas após o preparo (tempo 0) e três meses depois (tempo 3).

Formulações	Tempo 0		Tempo 3	
	Tamanho das gotículas (nm)	Índice de polidispersão	Tamanho das gotículas (nm)	Índice de polidispersão
F1	127,9 ± 2,335	0,388 ± 0,046	127,1 ± 4,258	0,353 ± 0,037
F1I	143,7 ± 1,097	0,243 ± 0,010	141,6 ± 1,089	0,253 ± 0,015
F9	110,8 ± 2,458	0,256 ± 0,015	110,4 ± 0,3786	0,241 ± 0,008
F9I	111,6 ± 1,473	0,304 ± 0,004	113,8 ± 1,172	0,248 ± 0,024

nm= nanômetro

De acordo com a Tabela 8, o tamanho das gotículas das formulações base (sem o derivado vegetal), F1 e F9, foi 127,9 ± 2,335 e 110,8 ± 2,458, respectivamente. A incorporação do derivado vegetal em ambas as formulações causou uma pequena variação no tamanho das gotículas, sem exceção, variando de 143,7 ± 1,097 a 111,6 ± 1,473. Todos os valores obtidos estão na faixa de 10-250 nm (100-2500 Å), intervalo ideal para sistemas nanoemulsionados segundo as considerações feitas por Formariz et al. 2010.

Quando se compara as formulações sem a presença do derivado vegetal (F1 e F9) e as formulações as quais o extrato foi incorporado (F1 I e F9 I), observa-se um pequeno aumento no tamanho das gotículas, sendo esse um forte indício de que realmente ocorreu a incorporação do mesmo no sistema lipídico. O índice de polidispersidade (IPD) é o índice que mostra a homogeneidade relativa entre os tamanhos das partículas distribuídos na amostra medida. Os valores de IPD variaram entre 0,243 ± 0,010 a 0,388 ± 0,046 apresentando uma média faixa de variação entre a base e as formulações com o derivado vegetal incorporado, esses dados permitem inferir que as amostras apresentam certa homogeneidade.

Analisando os resultados de tamanho de gotícula e índice de polidispersidade após 3

meses do preparo pode-se observar que praticamente não houve alteração nenhuma entre as medidas no tempo 0 e tempo 3, o que nos permite inferir que as formulações bases e as que contém o extrato vegetal incorporado (F1 I e F9 I) são estáveis durante o período ao qual foram analisadas.

5.3.3. Análise do potencial Zeta (PZ)

A Tabela 9 apresenta os valores de PZ obtidos sob as formulações que continham ou não o derivado vegetal incorporado. Os dados expressos referem-se à análises realizadas após o preparo das formulações (Tempo 0) e três meses após (Tempo 3).

Tabela 9. Média e desvio-padrão do potencial Zeta das formulações com e sem a presença do derivado vegetal nos tempos 0 e 3 meses após o preparo das formulações

	Potencial Zeta (mV)	
Formulação	**Tempo 0**	**Tempo 3**
F1	5,88 ± 0,271	5,60 ± 0,0917
F1 I	6,54 ± 0,347	6,29 ± 0,191
F9	2,16 ± 0,186	2,07 ± 0,335
F9 I	1,85 ± 0,393	1,95 ± 0,293

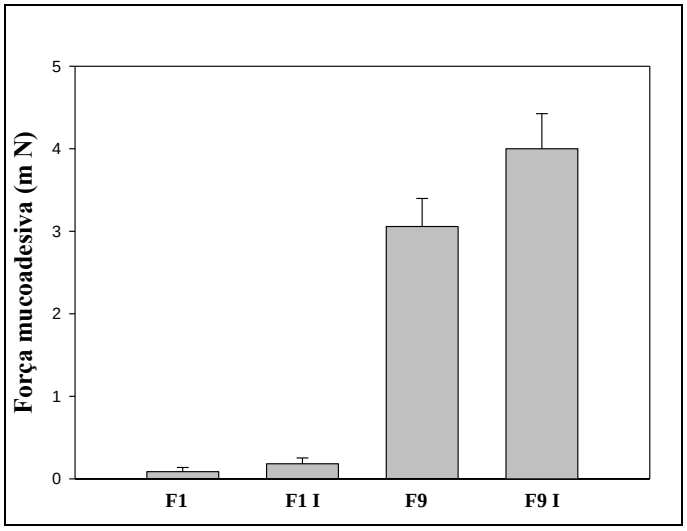
Diante dos resultados obtidos observa-se ainda uma redução do valor de PZ ao aumentar a concentração de tensoativo na formulação, ou seja, ao aumentar a concentração de tensoativo há um aumento de carga negativa proveniente da fosfatidilcolina de soja, consequentemente há uma redução do valor do PZ de F1 para F9.

Os valores obtidos nas análises de PZ após 3 meses do preparo das amostras foram praticamente os mesmos valores obtidos após 24 horas e isso indica a estabilidade das partículas que compõe o sistema.

5.3.4. Avaliação *in vitro* da forca mucoadesiva

A Figura 36 apresenta o perfil adesivo das formulações, o qual foi obtido após o destacamento da mucosa vaginal de suíno.

Figura 36. Resultados da avaliação da força mucoadesiva *in vitro* das formulações desenvolvidas



Fonte: Autor

De acordo com estes dados pode-se confirmar que a F9 apresenta característica mucoadesiva maior quando em comparação com a F1, o que se mostra ideal para a aplicação tanto nos ensaios biológicos de inibição de biofilmes quanto no ensaio experimental *in vivo* de terapia da candidíase vulvovaginal ocasionada por *C. albicans*.

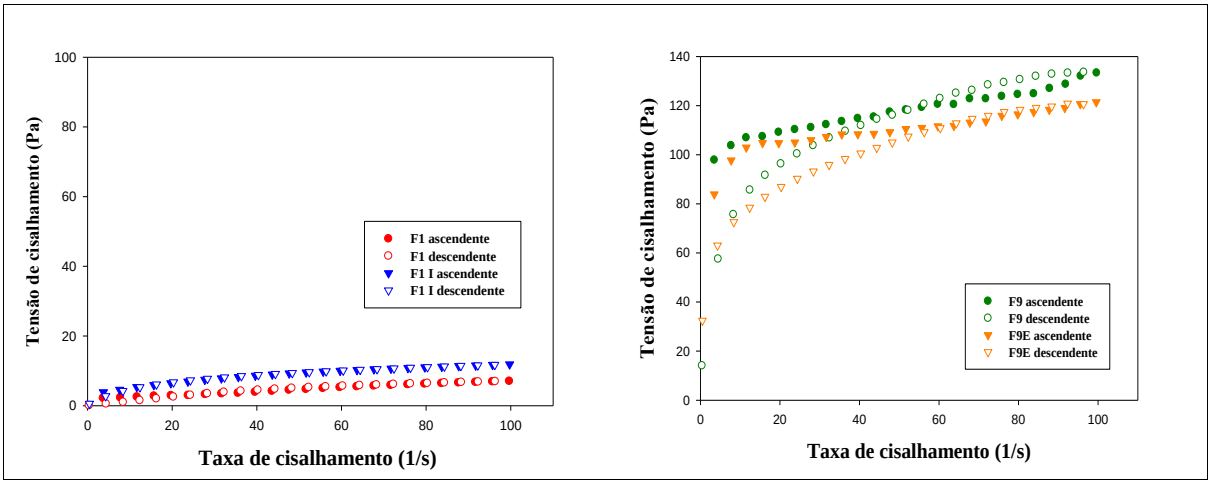
Adicionalmente observa-se que a incorporação do derivado vegetal no sistema conferiu uma maior mucoadesividade em ambas formulações base (F1 e F9), o que confirmam os resultados obtidos no ensaio de MLP, os quais mostraram que a incorporação conferiu maior estruturação dos sistemas.

5.3.5. Ensaios reológicos

5.3.5.1. Ensaio reológico de fluxo contínuo

A Figura 37 apresenta os reogramas de fluxo contínuo que expressam o comportamento reológico contínuo das formulações F1 e F9 livre e com a presença do derivado vegetal.

Figura 37. Comportamento reológico contínuo das formulações F1, F1 I, F9 e F9 I



Fonte: O autor

A Tabela 10 apresenta as características referentes ao comportamento de fluxo (*n*) e consistência das formulações (*k*).

Tabela 10. Comportamento de fluxo (n) e índice de consistência (K) das formulações livres (F1 e F9) e com o derivado vegetal (F1 I e F9 I)

Amostra	***n***	***k***
F1	1,0093 ± 0,038	0,3648 ± 0,004
F1 I	0,5272 ± 0,025	0,6118 ± 0,06
F9	0,0902 ± 0,005	79,842 ± 1,63
F9 I	0,1058 ± 0,005	84,0316 ± 1,81

De acordo com estes dados pode-se concluir que ambas amostras possuem características reológicas distintas. A formulação F1 apresentou característica fluídos newtonianos, o que é compatível com a forma líquida e menos viscosa da formulação, entretanto, após a incorporação do extrato vegetal observou-se mudança no perfil reológico da mesma, passando a assumir a característica de formulação pseudoplástica, o que é justificado uma vez que após a incorporação no sistema observou-se que o mesmo se mostrou mais estruturado (rígido, levemente mais viscoso). Estas afirmações podem ser concluídas através da observação dos valores de *k* os quais mostram a superioridade do perfil de viscosidade apresentado por F1 I.

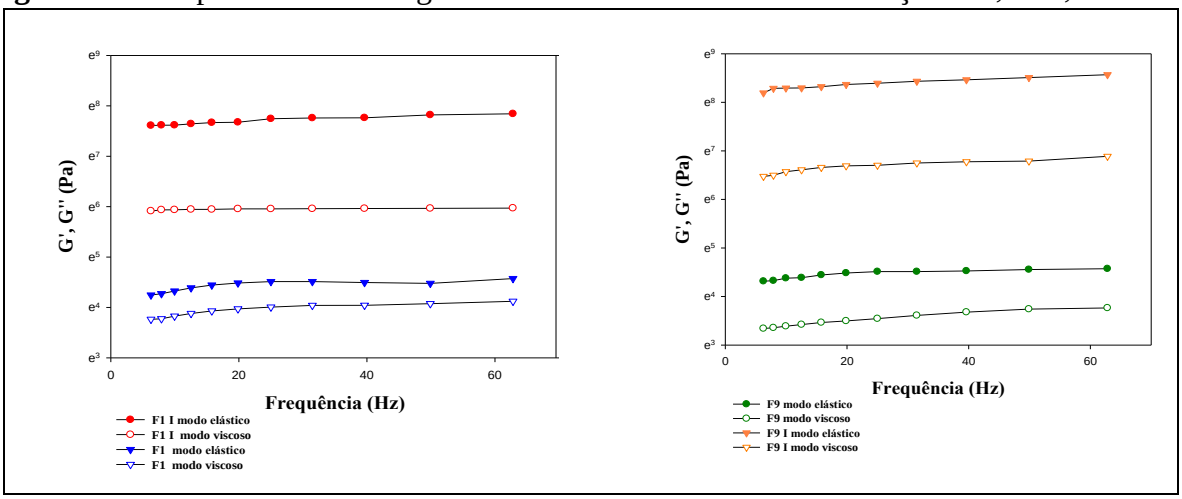
Já no caso de F9 e F9I foi encontrado um perfil reológico de formulações pseudoplásticas.

5.3.5.1. Ensaio reológico de fluxo oscilatório

A Figura 38 apresenta os reogramas de fluxo oscilatório que expressam o comportamento reológico das formulações F1 e F9 livre e com a presença do derivado vegetal neste tipo de análise.

É possível observar que o valor do módulo de armazenamento (G`) foi superior ao G``, caracterizando assim formulações elásticas. Esse resultado indica um comportamento predominantemente viscoso. Adicionalmente, nota-se que estes valores foram incrementados com a incorporação do derivado vegetal, o que era esperado, visto que após este processo foi verificado um aumento visual da viscosidade das formulações.

Figura 38. Comportamento reológico em fluxo oscilatório das formulações F1, F1 I, F9 e F9I



Fonte: O autor

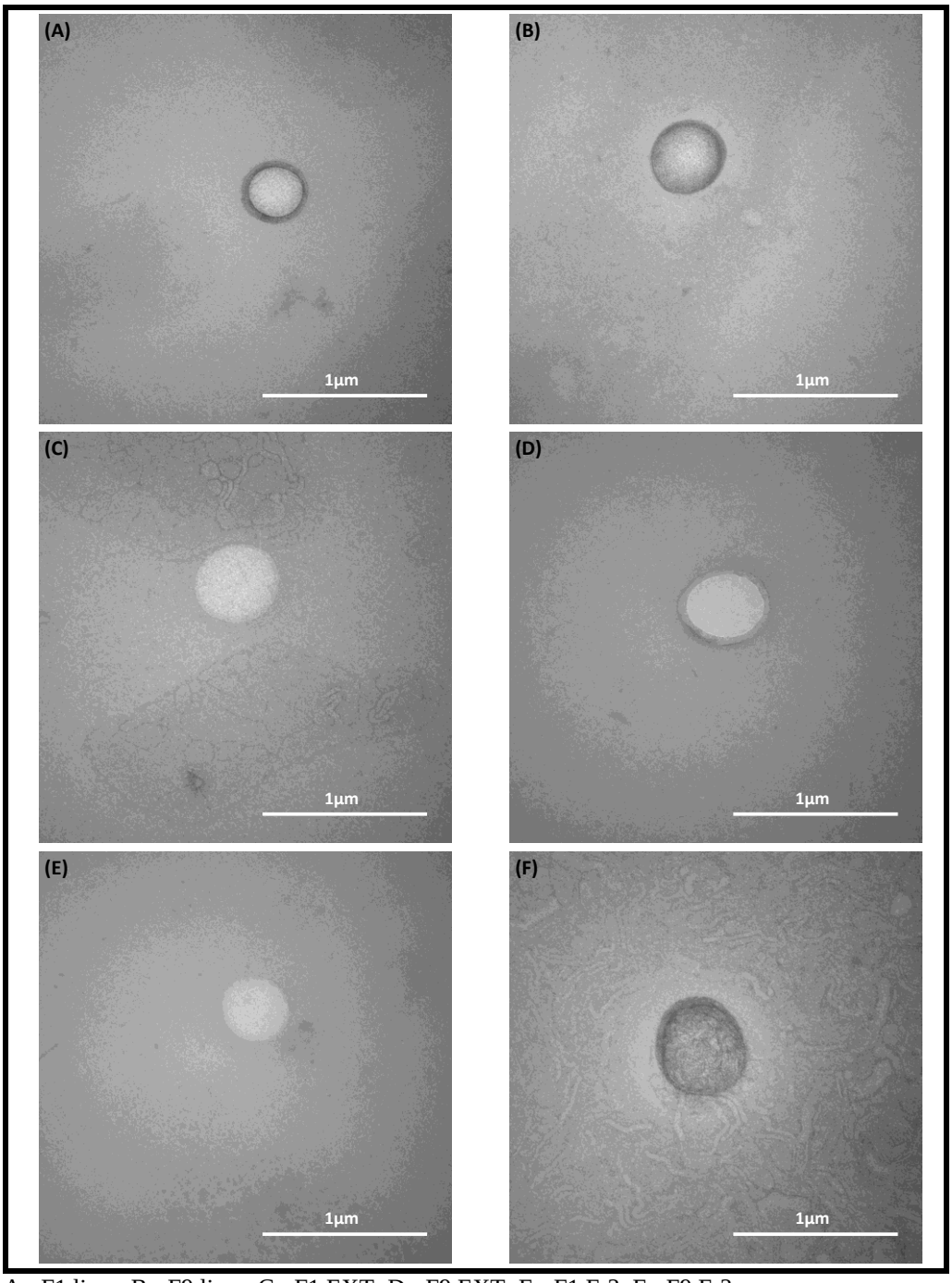
Formulações elásticas mostram-se interessantes para a administração de fármacos por via intravaginal, uma vez que podem conferir um maior padrão de adesividade na via administrada. Visto estas características conferidas às formulações e a superioridade da elasticidade observada após a incorporação, conclui-se que estas formulações (em especial a F9 a qual apresentou perfil superior) estão aptas para serem veículos de biotavos por via intravaginal.

5.3.6. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

A Figura 39 apresenta as imagens obtidas por TEM das formulações F1 e F9 sem a presença do dos derivados vegetais, bem como após a incorporação do extrato (F1 EXT e F9

EXT) e da Fr3 (F1 Fr3 e F9 Fr3) sob aumento de 100.00 X.

Figura 39. Imagens obtidas por TEM das formulações F1 e F9 sem a presença do dos derivados vegetais e após a incorporação do extrato (F1 EXT e F9 EXT) e da Fr3 (F1 Fr3 e F9 Fr3) sob aumento de 100.00 X.



A= F1 livre; B= F9 livre; C= F1 EXT; D= F9 EXT; E= F1 Fr3, F= F9 Fr3

Fonte: O autor

As imagens apresentadas acima mostram que as gotículas presentes nas formulações livres possuem formato esférico e o tamanho observado é condizente com os padrões estabelecidos para confirmação de nanoemulsões. Estes dados confirmam mais uma vez a formação dos sistemas.

5.4. Determinação do potencial antimicrobiano do extrato de *S. nitens* e da fração Fr3 sobre células planctônicas

O extrato metanólico de *S. nitens* bem como a fração Fr3 foram incorporados nas formulações F1 e F9 originando as seguintes amostras : F1 EXT e F9 EXT (formulações com o extrato incorporado); F1 Fr3 e F9 Fr3 (formulações com a fração Fr3 incorporada.

A Tabela 11 apresenta os valores de CIM e CFM dos derivados vegetais incorporados e não incorporados nos sistemas de liberação contra as cepas de *C. albicans* e a Tabela 12 apresenta os valores de CIM e CBM sobre as cepas de *L. acidophilus* e *G. vaginalis.* A Tabela 13 apresenta os resultados de CIM de EXT e Fr3 livres e incorporados nas formulações F1 e F9 sobre as linhagens não-*albicans* empregadas nesta investigação.

Tabela 11. Resultados do potencial antimicrobiano do extrato metanólico de *S. nitens* livre e incorporado nas formulações (F1 EXT e F9 EXT) e da fração Fr3 livre e incorporada (F1 Fr3 F9 Fr3) sobre as cepas de *C. albicans*

Amostra	Cepas de *C. albicans*				
	ATCC10231	**CAV3**	**CAS1**	**Urine 1**	**Urine 2**
	***CIM/CFM**	***CIM/CFM**	***CIM/CFM**	***CIM/CFM**	***CIM/CFM**
EXT	250/500	1000/>1000	500/500	500/1000	500/500
F1 EXT	62,5/125	125/250	250/500	31,2/500	62,5/15,6
F9 EXT	62,5/125	125/250	500/1000	62,5/250	15,6/15,6
Fr3	62,5/250	125/500	62,5/250	62,5/500	250/500
F1 Fr3	31,2/125	62,5/125	15,6/125	7,8/15,6	15,6/31,2
F9 Fr3	31,2/62,5	62,5/62,5	15,6/125	7,8/15,6	3,9/31,5
F1	-	-	-	-	
F9	-	-	-	-	

* valores expressos em µg/mL; (-) sem inibição; CIM= concentração inibitória mínima; CFM= concentração fungicida mínima

Tabela 12. Resultados do potencial antimicrobiano do extrato metanólico de *S. nitens* livre e incorporado nas formulações (F1 EXT e F9 EXT) e da fração Fr3 livre e incorporada (F1 Fr3 F9 Fr3) sobre as cepas de *L. acidophilus* e *G. vaginalis*

Amostra	Cepas bacterianas	
	***L. acidophilus* ATCC 4356**	***G. vaginalis* BME-1**
	***CIM/CBM**	***CIM/CBM**
EXT	>1000/>1000	>1000/>1000
F1 EXT	1000/>1000	1000/>1000
F9 EXT	>1000/>1000	1000/>1000
Fr3	500/>1000	500/500
F1 Fr3	500/1000	500/1000
F9 Fr3	500/>1000	500/1000
F1	-	-
F9	-	-

* valores expressos em µg/mL; (-) sem inibição; CIM= concentração inibitória mínima; CBM= concentração bactericida mínima

Tabela 13. Atividade antifúngica *in vitro* do extrato bruto não incorporado (EXT) e incorporado nas formulações F1 e F9 (F1 EXT e F9EXT) e da fração Fr3 não incorporada (Fr3) e incorporada (F1Fr3 e F9Fr3) frente às cepas não-*albicans*

Cepa fúngica	Amostras avaliadas (µg/ml)											
	EXT		**F1EXT**		**F9EXT**		**Fr3**		**F1Fr3**		**F9Fr3**	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
CK ATCC	125	1000	62,5	500	62,5	500	31,2	1000	15,6	500	15,6	1000
CKV	125	>1000	62,5	500	62,5	500	62,5	500	15,6	1000	31,2	250
CG ATCC	62,5	500	15,6	250	62,5	500	500	>1000	125	500	125	500
CGV	62,5	1000	15,6	500	15,6	500	1000	>1000	250	1000	250	1000
CT ATCC	250	1000	250	500	250	250	31,2	>1000	15,6	1000	15,6	1000
CTV	500	500	125	500	125	500	62,5	500	62,5	250	62,5	250
CP ATCC	250	1000	125	1000	125	500	250	1000	125	500	125	500
CPV	500	500	250	250	250	500	500	1000	125	1000	125	1000

CAATCC, CKATCC, CGATCC, CTATCC, CPATCC= cepas padrões de *C. albicans, C. krusei, C. glabrata, C. tropicalis, C. parapsilosis*, respectivamente. CAV, CKV, CGV, CTV, CPV = cepas clínicas de *C. albicans, C. krusei, C. glabrata, C. glabrata, C. tropicalis, C. parapsilosis*, respectivamente; CIM= concentração inibitória mínima; CFM= concentração fungicida mínima

Nota-se que ambas as formulações foram capazes de promover o aumento da atividade antifúngica das amostras vegetais e um discreto aumento da atividade antibacteriana. Sendo assim, estes dados mostram a seletividade antifúngica destes compostos e a superioridade de ação em relação a bactérias encontradas no ambiente vaginal.

Pode-se observar que houve semelhança entre os valores de CIM obtidos, o que mostra que ambos os sistemas se comportaram de maneira semelhante no aprimoramento da atividade antimicrobiana, com exceção apenas para uma cepa fúngica no ensaio com o extrato incorporado na F9.

Adicionalmente verificou-se que a base dos sistemas (F1 e F9) não possuem atividade antimicrobiana, o que comprova que a utilização destes sistemas foi capaz de potencializar a atividade biológica dos derivados vegetais.

5.5. Determinação do mecanismo de ação dos derivados de S. nitens não incorporados e incorporados sobre *C. albicans*

5.5.1 Ensaio com ergosterol

A Tabela 14 apresenta os valores de CIM das amostras avaliadas em ausência (A) e presença (P) de exógenos de ergosterol frente à cepa padrão de *C. albicans* ATCC 10231 e a cepa clínica CAV.

Tabela 14. Avaliação *in vitro* do potencial inibitório do extrato bruto não incorporado (EXT) e incorporado nas formulações F1 e F9 (F1 EXT e F9EXT) e da fração Fr3 não incorporada (Fr3) e incorporada (F1Fr3 e F9Fr3) e do fármaco padrão anfotericina B (AnB) em presença e ausência de exógenos de ergosterol frente às cepas padrão (ATCC 10231) clínica (CAV) de *C. albicans*.

Cepas de *C. albicans*	**CIM (µg/mL)**													
	EXT		**F1EXT**		**F9EXT**		**Fr3**		**F1Fr3**		**F9Fr3**		**AnB**	
	(A)	(P)	(A)	(P)	(A)	(P)	(A)	(P)	(A)	(P)	(A)	(P)	(A)	(P)
CAATCC	500	1250	62,5	312,5	62,5	156,2	62,5	625	31,2	625	31,2	1250	0,12	4
CAV	1000	2500	125	312,5	125	312,5	125	625	62,5	1250	62,5	625	0,12	4

(CAATCC) cepa padrão de *C. albicans* ATCC 10231; (CAV) cepa clínica vaginal de *C. albicans;* (A) ausência de exógenos de ergosterol; (P) presença de exógenos de ergosterol

Os resultados demonstram que houve significativo aumento dos valores de CIM de ambos derivados de *S. nitens* incorporados e não incorporados. Estes dados indicam que um dos mecanismos que condicionam a atividade antifúngica que vem sendo observada está relacionada à permeabilidade de íons à membrana de *C. albicans.* A medida que se tem um aumento dos níveis de ergosterol (principal constituinte da membrana de *C. albicans*) no ambiente em que o composto ativo está sendo testado, este fenômeno acarreta no aumento dos valores da CIM anteriormente verificado na ausência de exógenos de ergostrol.

5.5.2. Ensaio com sorbitol

A Tabela 15 apresenta os dados referentes ao ensaio com a ausência (A) e presença de sorbitol (P) mostrando a ação das amostras avaliadas nas diferentes concentrações (1000 μg/mL a 0,48 μg/mL) sobre a cepa clínica vaginal de *C. albicans* CAV.

Tabela 15. Potencial inibitório *in vitro* do extrato bruto não incorporado (EXT) e incorporado nas formulações F1 e F9 (F1 EXT e F9EXT) e da fração Fr3 não incorporada (Fr3) e incorporada (F1Fr3 e F9Fr3) em presença e ausência de sorbitol frente à cepa clínica de *C. albicans* CAV.

Concentrações das amostras vegetais (μg/mL)	**Amostras vegetais**											
	EXT		**F1EXT**		**F9EXT**		**Fr3**		**F1Fr3**		**F9Fr3**	
	(P)	(A)	(P)	(A)	(P)	(A)	(P)	(A)	(P)	(A)	(P)	(A)
1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
500	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
250	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
125	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
62,5	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
31,2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15,6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7,8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3,9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1,9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,95	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,48	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

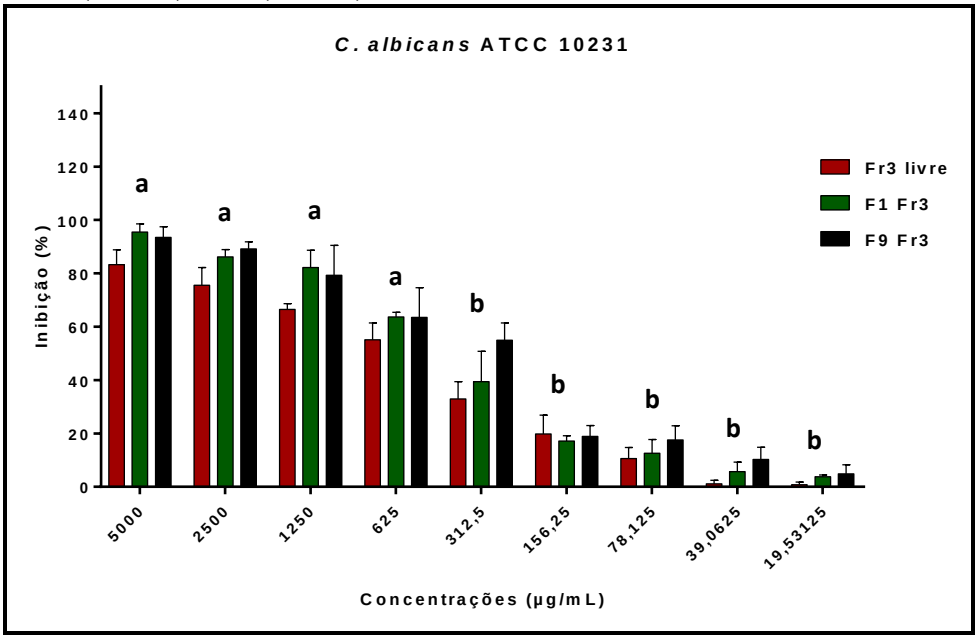
(A) ausência de sorbitol; (P) presença de sorbitol; (+) crescimento microbiano; (-) ausência de crescimento microbiano

Da mesma maneira que nos ensaios com a cepa padrão, não foram evidenciadas diferenças nos valores inibitórios em presença ou ausência de sorbitol nos ensaios com a cepa clínica de *C. albicans.* Estes dados já eram esperados uma vez que se tratam da mesma espécie fúngica.

5.6. Análise da fração Fr3 no potencial anti-biofilme de *C. albicans*

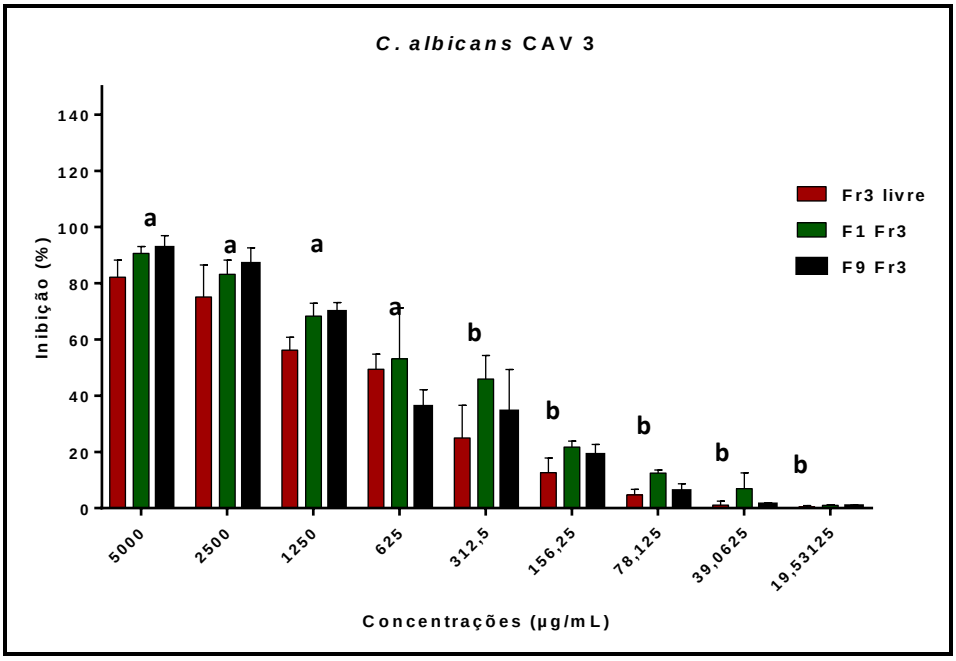
As Figuras 40, 41 e 42 apresenta os resultados de inibição de biofilmes maduros exercidos pela fração Fr3 (não incorporada e incorporada) sobre os biofilmes de *C. albicans* ATCC 10231, CAV3 e CAS1.

Figura 40. Resultados do potencial anti-biofilme *in vitro* da fração Fr3 livre e incorporada na formulação F1 (F1 Fr3) e F9 (F9 Fr3) sobre biofilmes maduros de *C. albicans* ATCC 10231



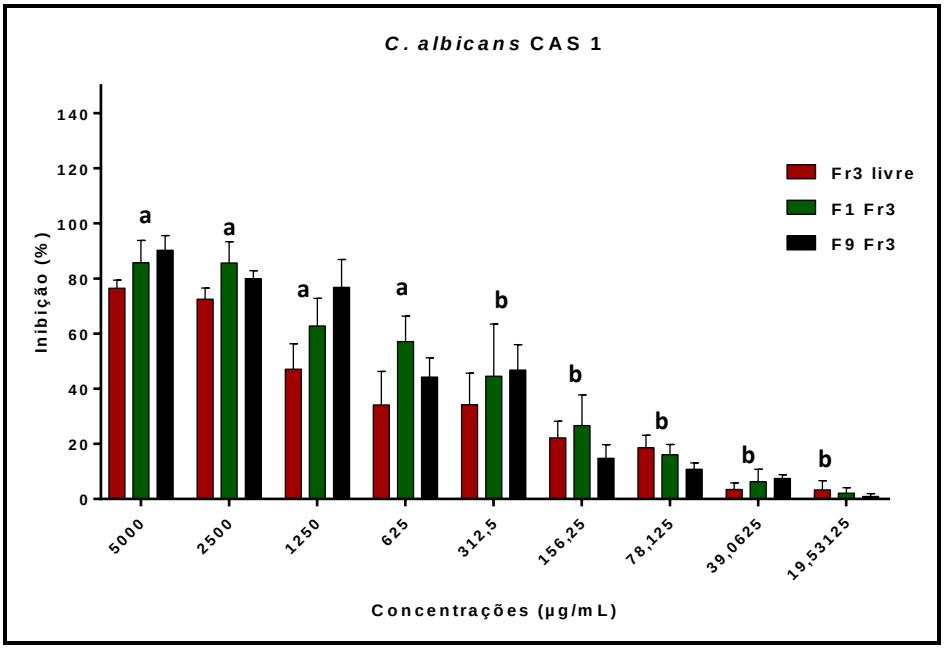
Fr3 livre = fração 3 de *S. nitens* não incorporada; F1Fr3= fração 3 de *S. nitens* incorporada na formulação F1; F9Fr3= fração 3 de *S. nitens* incorporada na formulação F9. Letras diferentes significam diferença significativa entre os grupos observada através da estatística ANOVA com pós-teste de Tukey com limiar de 0,05 . **Fonte:** O autor

Figura 41. Resultados do potencial anti-biofilme *in vitro* da fração Fr3 livre e incorporada na formulação F1 (F1 Fr3) e F9 (F9 Fr3) sobre biofilmes maduros de *C. albicans* CAV 3



Fr3 livre = fração 3 de *S. nitens* não incorporada; F1Fr3= fração 3 de *S. nitens* incorporada na formulação F1; F9Fr3= fração 3 de *S. nitens* incorporada na formulação F9. Letras diferentes significam diferença significativa entre os grupos observada através da estatística ANOVA com pós-teste de Tukey com limiar de 0,05 **Fonte:** O autor

Figura 42. Resultados do potencial anti-biofilme *in vitro* da fração Fr3 livre e incorporada na formulação F1 (F1 Fr3) e F9 (F9 Fr3) sobre biofilmes maduros de *C. albicans* CAS 1



Fr3 livre = fração 3 de *S. nitens* não incorporada; F1Fr3= fração 3 de *S. nitens* incorporada na formulação F1; F9Fr3= fração 3 de *S. nitens* incorporada na formulação F9. Letras diferentes significam diferença significativa entre os grupos observada através da estatística ANOVA com pós-teste de Tukey com limiar de 0,05 **Fonte:** O autor

Em todos os casos nota-se que os tratamentos foram eficazes e promoveram a inibição dos biofilmes. Observa-se ainda, que a atividade da Fr3 foi potencializada após a incorporação em ambas a formulações, o que qualifica estes sistemas como promissores em potencializar a atividade anti-biofilme, bem como nos ensaios com células planctônicas.

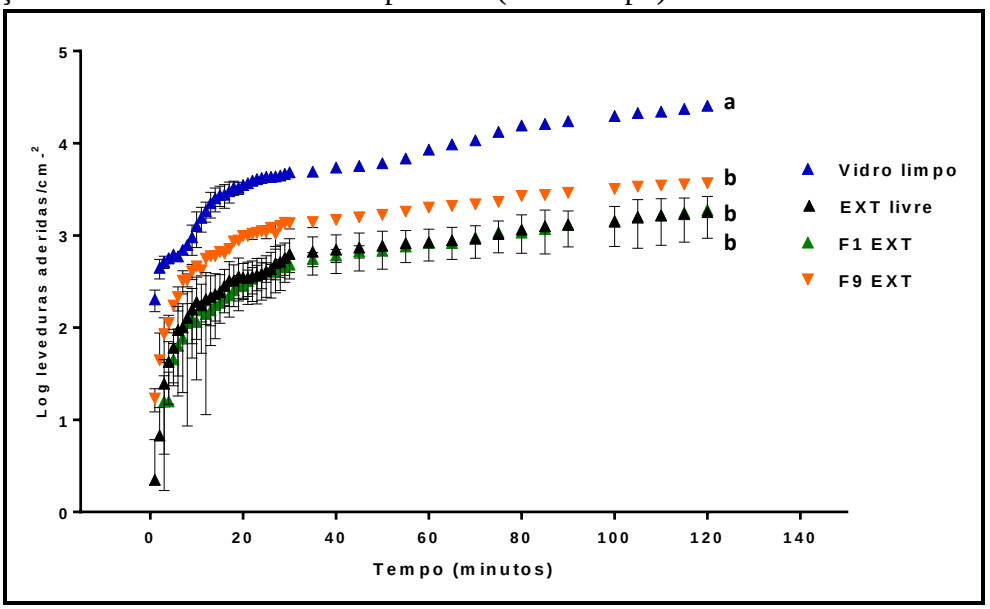
5.7. Aprimoramento dos estudos da ação dos derivados de *S. nitens* sobre biofilmes associados com a CVV

5.7.1. Cinética de adesão de *C. albicans* em superfície sob condições de fluxo (Ensaio de adesão em câmara de fluxo – flow chamber)

As Figuras 43 e 44 apresentam a cinética de adesão de *C. albicans* ATCC 10231 sobre superfícies de vidro contendo as amostras do extrato metanólico (EXT, F1 EXT e F9 EXT) e da fração Fr3 (Fr3, F1 Fr3 e F9 Fr3) respectivamente.

Os valores expressos nos gráficos são apresentados em média e desvio padrão oriundos de três experimentos realizados nas mesmas condições empregando-se um novo crescimento microbiano e novas amostras em cada avaliação.

Figura 43. Cinética de adesão de *C. albicans* ATCC 10231 em câmara de fluxo hidrostático contendo as amostras do extrato metanólico de *S. nitens* 1,0 mg / mL (EXT livre) e incorporado nas formulações 1 (F1 EXT) e 9 (F9 EXT) na mesma concentração, em comparação com o controle de adesão positivo (vidro limpo).

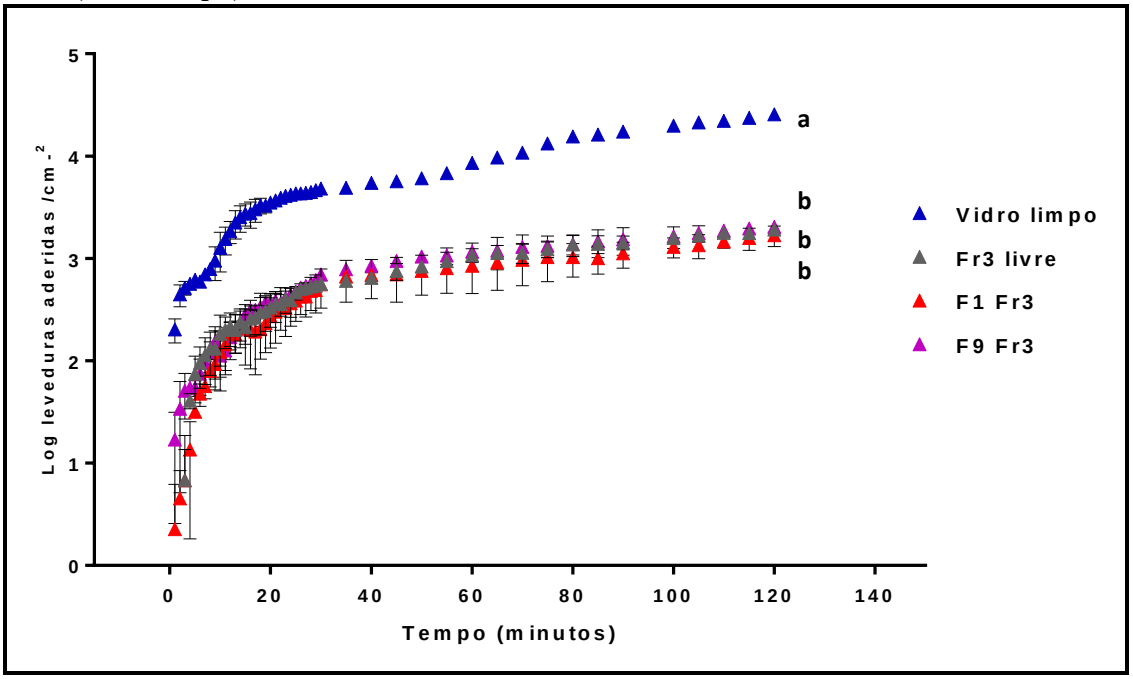


EXT livre = extrato bruto de *S. nitens* não incorporada; F1EXT= extrato bruto de *S. nitens* incorporado na formulação F9EXT= extrato bruto de *S. nitens* incorporado na formulação F9. Letras diferentes significam diferença significativa entre os grupos observada através da estatística ANOVA com pós-teste de Tukey com limiar de 0,05 **Fonte:** O autor

De acordo com os dados expressos na Figura 42 nota-se que todas as amostras contendo o extrato metanólico de *S. nitens* foram capazes de reduzir a adesão de *C. albicans* sobre a superfície avaliada, uma vez que em ausência dos compostos avaliados (vidro limpo) observa-se uma adesão contínua e exponencialmente maior. Entretanto, não foram observados diferenças entre o extrato não incorporado (EXT) e incorporado nas formulação F1 (F1 EXT), a razão de tal evento pode estrar relacionada com a liberação do composto vegetal no interior da câmara fluxo durante o proce3sso de adsorção sobre a superfície.

Os resultados oriundos do extrato metanólico incorporado na F9 (F9 EXT) mostraram-se menos promissor no desempenho da inibição da adesão. Este remete-se a uma característica diferente deste sistema no que se diz respeito ao seu perfil de liberação, uma vez que pode ter retido o derivado vegetal no impedindo-o de alojar-se sobre a superfície do vidro.

Figura 44. Cinética de adesão de *C. albicans* ATCC 10231 em câmara de fluxo hidrostático contendo as amostras da Fração Fr3 - 1,0 mg / mL (Fr3 livre) e incorporada nas formulações 1 (F1 Fr3) e 9 (F9 Fr3) na mesma concentração, em comparação com o controle de adesão positivo (vidro limpo).



Fr3 livre = fração 3 de *S. nitens* não incorporada; F1Fr3= fração 3 de *S. nitens* incorporada na formulação F1; F9Fr3= fração 3 de *S. nitens* incorporada na formulação F9. Letras diferentes significam diferença significativa entre os grupos observada através da estatística ANOVA com pós-teste de Tukey com limiar de 0,05 **Fonte:** O autor

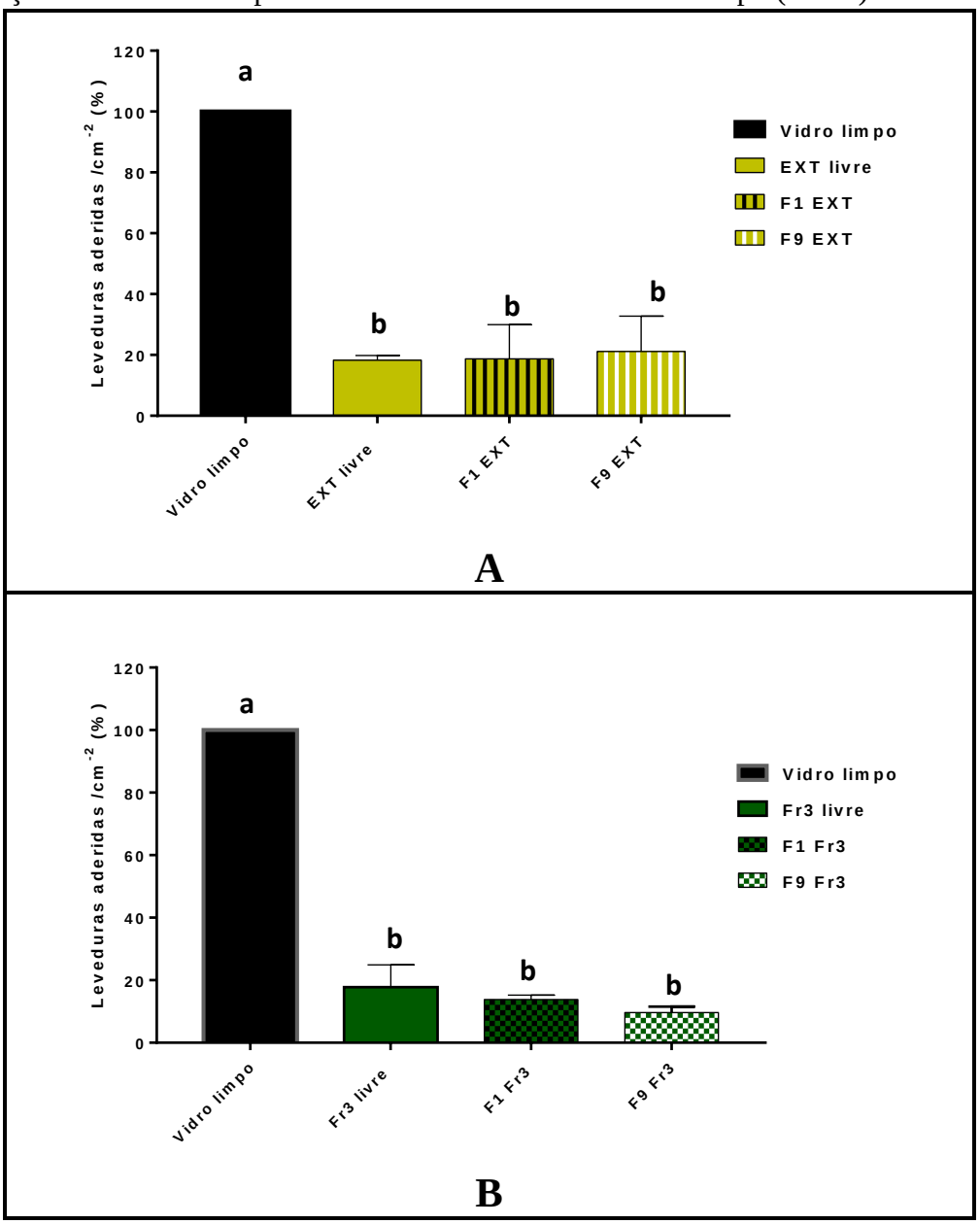
Nos ensaios realizados com amostras contendo a fração Fr3 (Figura 43) nota-se que

todas as amostras contendo este derivado vegetal foram capazes de reduzir a adesão de *C. albicans* sobre a superfície avaliada. Entretanto, não foram observados diferenças entre Fr3 não incorporada (Fr3 livre) e incorporado nas formulações F1 e F9 (F1 Fr3 e F9 Fr3), a razão de tal evento pode estrar relacionada com a liberação do composto vegetal no interior da câmara fluxo durante o processo de adsorção sobre a superfície.

5.7.1.1. Análise de adesão final

A Figura 45 apresenta os resultados referentes ao número final de leveduras aderidas à superfície após a passagem da interface líquido-ar no interior da câmara de fluxo nos experimentos com o extrato (Figura 45 A) e a fração Fr3 (Figura 45 B) em comparação com o número de leveduras aderidas à superfície do vidro limpo do experimento controle (positivo de adesão= vidro limpo sem a presença de nenhum composto). Os resultados são expressos em porcentagem de inibição da adesão empregando o numero de células aderidas à superfície do experimento controle positivo de adesão como sendo 100% de adesão em superfície.

Figura 45. Porcentagem de células de *C. albicans* ATCC 10231 aderentes em monocamadas contendo amostras de extrato metanólico de *S. nitens* (A) e amostras de fração Fr3 (B) em comparação com o controle positivo de aderência usando vidro limpo (100%).

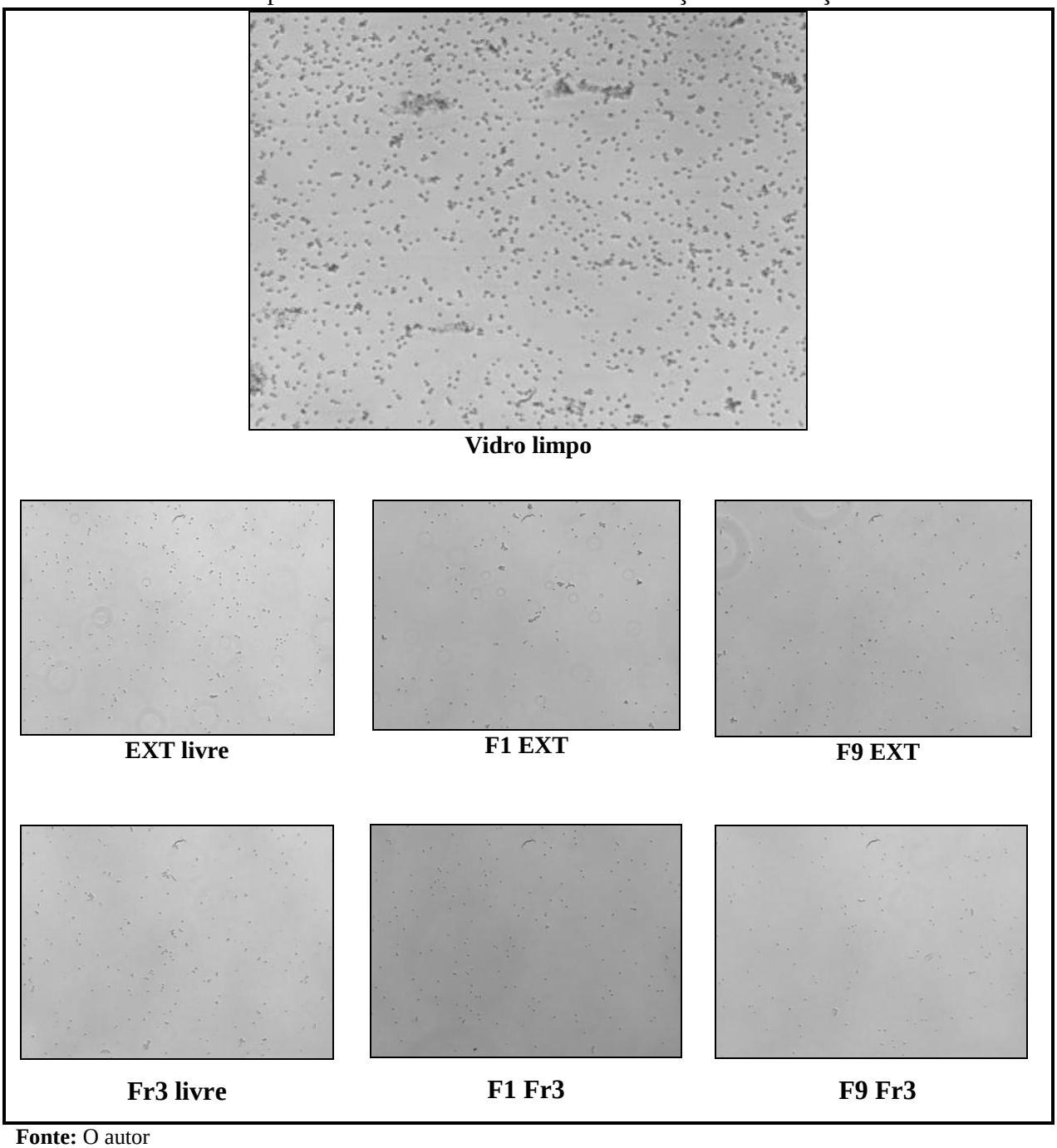


Vidro limpo= superfície de vidro limpa sem a presença das amostras; EXT livre = extrato bruto de *S. nitens* não incorporada; F1EXT= extrato bruto de *S. nitens* incorporado na formulação F9EXT= extrato bruto de *S. nitens* incorporado na formulação F9; Fr3 livre = fração 3 de *S. nitens* não incorporada; F1Fr3= fração 3 de *S. nitens* incorporada na formulação F1; F9Fr3= fração 3 de *S. nitens* incorporada na formulação F9. Letras diferentes significam diferença significativa entre os grupos observada através da estatística ANOVA com pós-teste de Tukey com limiar de 0,05. **Fonte:** O autor

Os dados expressos na Figura 45 mostram claramente que a presença dos compostos inibiu significativamente a adesão das células leveduriformes de à superfície. Adicionalmente nota-se uma discreta superioridade de ação antiaderente desempenhada pelas amostras

contendo a fração Fr3. A Figura 46 apresenta imagens representativas dos experimentos realizados. As imagens apresentadas são oriundas da captura final (Objetiva= 10X) das superfícies após a passagem da interface líquido-ar.

Figura 46. Fotomicrografia obtida por microscopia óptica (10X) apresentando uma comparação entre o grupo de controle positivo de adesão (vidro limpo) composto por vidro limpo e os experimentos contendo as amostras do extrato metanólico (EXT livre, F1 EXT, F9 EXT) e a fração (Fr3 livre, F1 Fr3, F9 Fr3), após a passagem de uma interface líquido-ar sobre células aderidas após a cinética de fluxo de 2h em condições de balanço hidrostático.



Fonte: O autor

5.7.1.2. Análises das monocamadas contendo os derivados vegetais sobre a superfície

5.7.1.2.1. Ângulo de contato da água

A Tabela 16 apresenta os valores de ângulo de contato referentes à deposição de água à superfície das monocamadas contendo as amostras avaliadas.

Tabela 16. Resultados da análise de ângulo de contato da agua sobre laminas de vidro com a presença e ausência dos derivados vegetais incorporados e não incorporados nos sistemas de liberação de fármacos

Amostra sobre a superfície	* Ângulo de contato da água (˚)			
	Tempo 1		**Tempo 2**	
	Presença	*Ausência*	*Presença*	*Ausência*
EXT	10.0 ±1.4	0.0±0	0.0±0	0.0±0
Fr3	9.0±0.9	0.0±0	0.0±0	0.0±0
F1EXT	19.0±1.1	0.0±0	0.0±0	0.0±0
F9EXT	20.0±0.9	0.0±0	0.0±0	0.0±0
F1Fr3	21.0±0.9	0.0±0	0.0±0	0.0±0
F9Fr3	20.0±1.4	0.0±0	0.0±0	0.0±0
F1	15.0±1.2	0.0±0	0.0±0	0.0±0
F9	18.0±1.3	0.0±0	0.0±0	0.0±0

*Valores expressos em média ± desvio padrão obtidos por meio de 7 deposições de gotas de água em diferentes regiões da extensão das amostras no tempo 1 (deposição inicial instantânea) e tempo 2 (após 10 segundos).

Esses resultados mostraram que todas as amostras podem promover diferenças na superfície comparadas com o a superfície ausente das mesmas, as quais apresentam um ângulo de 0° em contato com a água, no entanto, observou-se que as amostras são compostas por compostos altamente hidrofílicos, isto foi provado depois de observar que as gotas depositadas às superfícies não apresentam estabilidade no tempo 2 (10 segundos após a deposição).

5.7.1.2.2. Análise da composição elementar das monocamadas por XPS

A Tabela 17 apresenta a porcentagem da composição elementar das superfícies contendo as monocamadas dos compostos adsorvidos sobre a superfície do vidro limpo baseando-se na presença de C_{1s}, $O_{1s,}$ Si_{2p} e $N_{1s.}$

Tabela 17. Composição elementar do vidro limpo e amostras contendo monocamadas dos derivados vegetais não incorporados (EXT e Fr3) e incorporados (F1 EXT, F9 EXT, F1 Fr3, F9 Fr3) nas formulações F1 e F9 sobre a superfície.

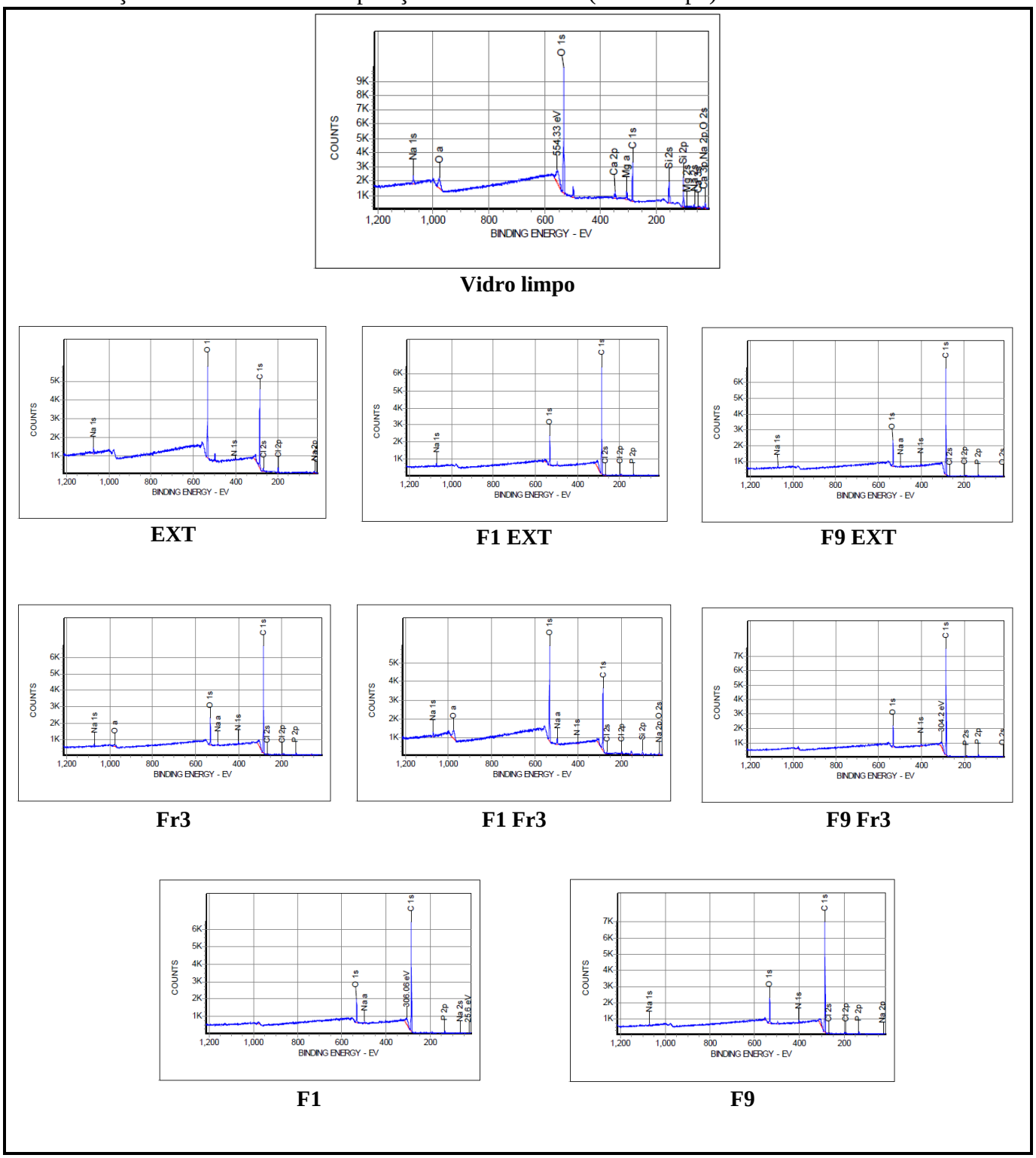
Amostras	Composição elementar [a]			
	C_{1s}	O_{1s}	Si_{2p}	N_{1s}
Vidro limpo	28.05±1.7	40.94±1.4	22.9±1.0	0.23±0.01
EXT	69.8±0.2	25.3±0.3	0.0±0.0	0.8±0.15
F1 EXT	82.6±0.6	12.2±0.1	0.0±0.0	1.8±0.1
F9 EXT	83.7±0.7	11.7±0.9	0.0±0.0	2.1±0.0
Fr3	83.6±0.6	10.7±0.1	0.0±0.0	10.7±0.1
F1 Fr3	64.9±2.3	27.9±1.3	0.0±0.0	0.8±0.2
F9 fr3	86.01±1.0	9.8±1.1	0.0±0.0	2.1±1.1
F1	87.6±1.0	9.4±1.3	0.0±0.0	1.55±0.0
F9	83.4±0.6	11.1±0.3	0.0±0.0	1.9±1.0

[a] Dados obtidos de dois experimentos e expressos em média ± desvio padrão da porcentagem da composição de cada composto avaliado.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 17 nota-se que todas as amostras que continham monocamadas dos compostos avaliados adsorvidos sobre a superfície apresentaram mudanças na composição elementar em comparação com a os dados obtidos no grupo controle, o qual foi composto por vidro limpo. Estes dados comprovam a presença das mesmas nos experimentos que verificou o comportamento de adesão de *C. albicans* sobre condições de fluxo hidrostático.

A Figura 47 apresenta os espectros gerais de absorção por XPS de cada uma das amostras mostrando a diferença composicional de cada uma das amostras. Os resultados são mostrados em energia de ligação (eV) das seguintes amostras: vidro limpo (sem presença das amostras), monocamada contendo o extrato metanólico de *S. nitens* não incorporado (EXT) e e incorporado na formulação F1 (F1 EXT) e F9 (F9 EXT), fração 3 não incorporada (Fr3) e e incorporada na formulação F1 (F1 Fr3) e F9 (F9 Fr3), formulação 1 sem derivado vegetal (F1) e formulação 9 sem derivado vegetal (F9).

Figura 47. Espectro de absorção geral por XPS apresentando as energias de ligação (eV) das amostras contendo os compostos vegetais não incorporados e incorporados nos sistemas de liberação de fármacos em comparação com o controle (vidro limpo)



Fonte: O autor

Nota-se a nítida diferença entre o vidro limpo e quando o mesmo contem as amostras adsorvidas à superfície. Em geral observa-se relativa mitificação composicional da superfície a qual foi diferente para cada uma das amostras.

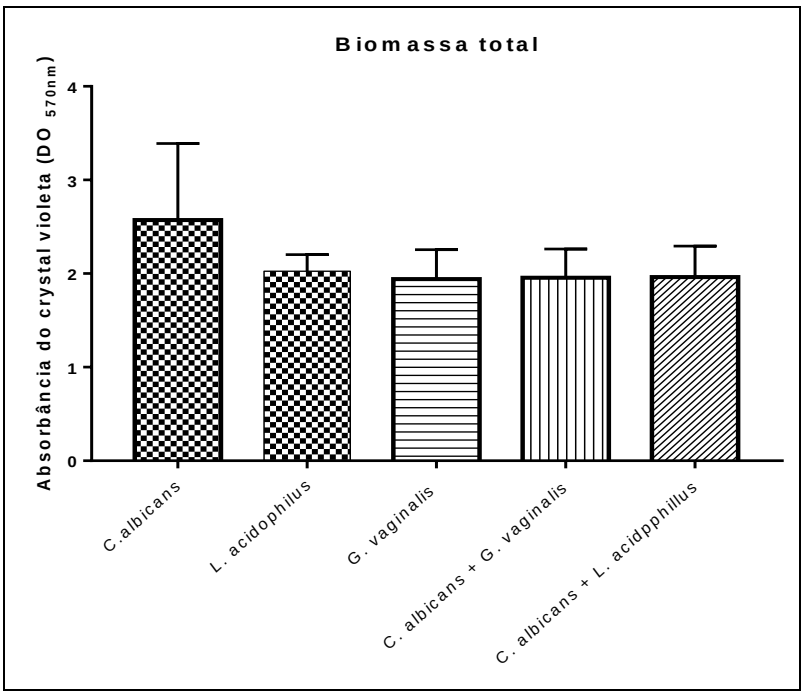
5.7.2. Avaliação do potencial anti-biofilme

5.7.2.1. Determinação da formação dos biofilmes

5.7.2.1.1. Obtenção da biomassa total pelo método de coloração do cristal violeta

A Figura 48 apresenta os dados referentes a determinação da biomassa total dos biofilmes formados sobre a superfície dos poços (1,9 cm^{-2}).

Figura 48. Quantificação da biomassa total dos biofilmes monotípicos e heterotípicos através da leitura em absorbância (570 nm) da coloração dos biofilmes após o método de cristal violeta



Fonte: O autor

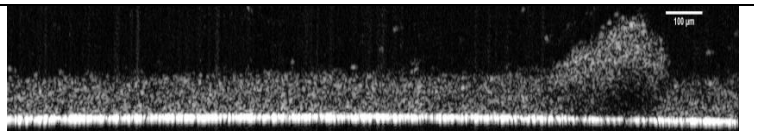
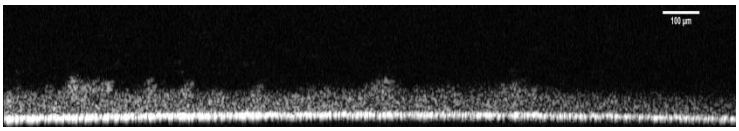
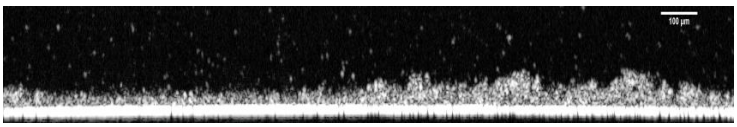
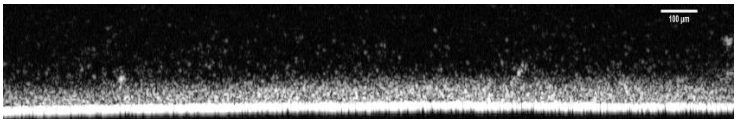
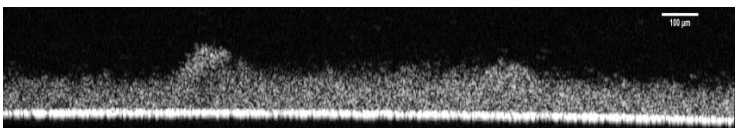
Segundo os dados apresentados pode-se confirmar que a formação dos biofilmes foram realizadas com sucesso. A determinação da densidade óptica (DO) obtida após a leitura espectrofotométrica das soluções oriundas da coloração dos biofilmes após o processo de coloração mostra que todos os tipos de biofilmes formados mostraram-se favoráveis para a

realização dos testes de atividade inibitória.

5.7.2.1.2. Análise da espessura dos biofilmes

A Tabela 18 apresenta os valores referentes a espessura dos biofilmes formados sobre a superfície dos pocos por meio de tomografia de coerência óptica (TCO) bem como imagens representativas em 2D de cada um dos biofilmes formados.

Tabela 18. Espessura e imagens por TCO dos biofilmes monotípicos e heterotípicos formados sobre a superfície de poços de placas de 24 orifícios após 48 horas de formação.

Biofilme	Espessura*	Imagens por TCO
C. a.	72.3±5.8	
G. v.	55.1±3.7	
L. a.	58.1±5.3	
C. a. + G. v.	64.1±4.4	
C. a. + L. a.	72,56±7.7	

*valores apresentados em media ± desvio padrão da espessura dos biofilmes (µm) obtidos em 10 varreduras. Biofilmes monotipicos: C.a.= *C. albicans* ATCC 10231; G.v.= *G. vaginalis* BME-1; L. a.= *L. acidophilus* ATCC 4356. Biofilmes heterotípicos: C.a.+G.v.= *C. albicans* ATCC 10231 + *G. vaginalis* BME-1; C.a.+L.a.= *C. albicans* ATCC 10231 + *L. acidophilus* ATCC 4356 .

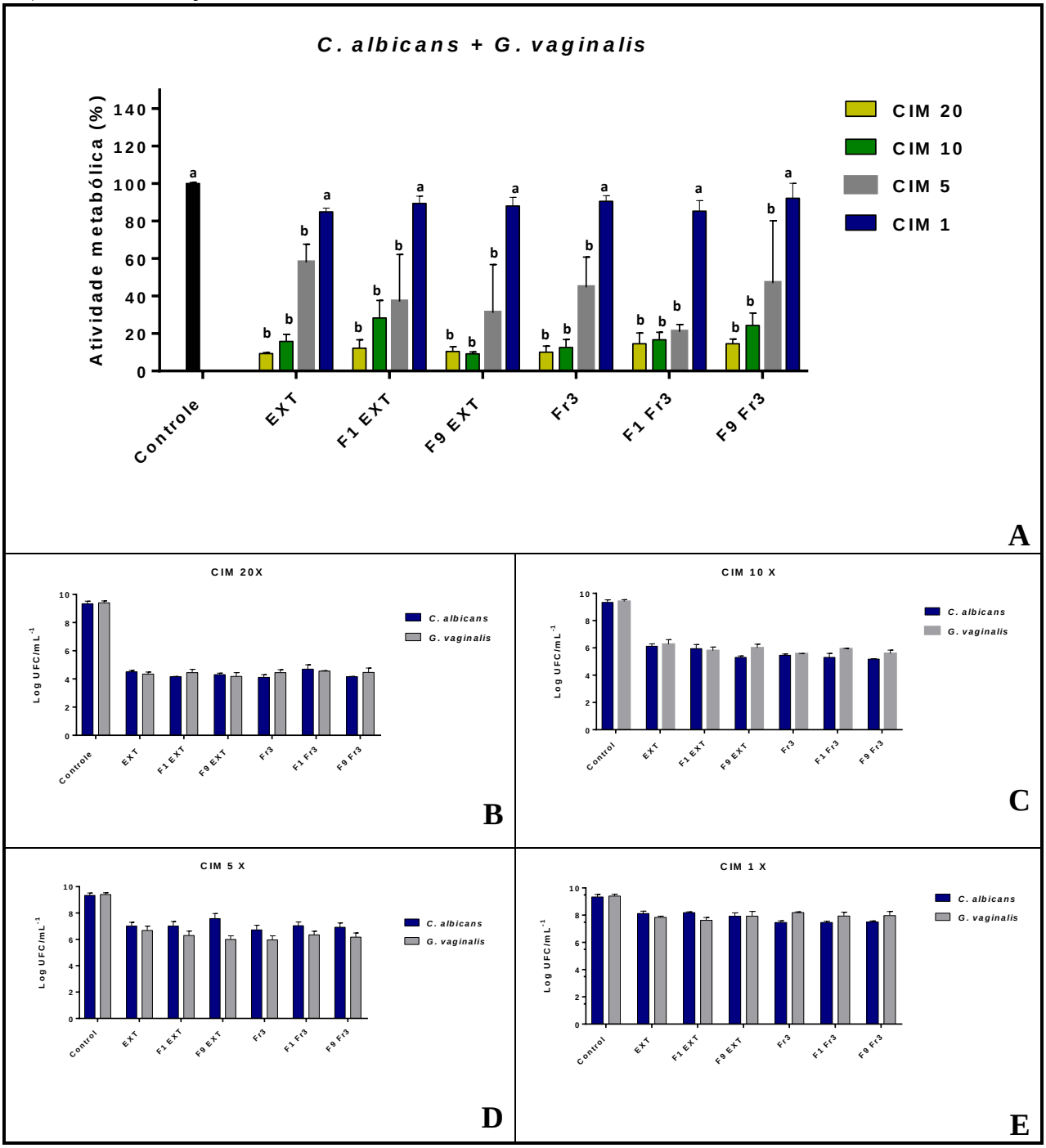
5.7.2.2. Determinação da ação antimicrobiana sobre biofilmes maduros associados com a CVV

5.7.2.2.1. Atividade sobre biofilmes heterotípicos

As Figuras 49 e 50 apresentam o perfil antimicrobiano dos derivados vegetais não incorporados (EXT e Fr3) e incorporados na formulação F1 (F1 EXT e F1 Fr3) e F9 (F9 EXT e F9 Fr3) sobre os biofilmes heterotípicos formados por *C. albicans* + *G. vaginalis* (MIX 1) e *C. albicans* + *L. acidophilus* (MIX 2) respectivamente.

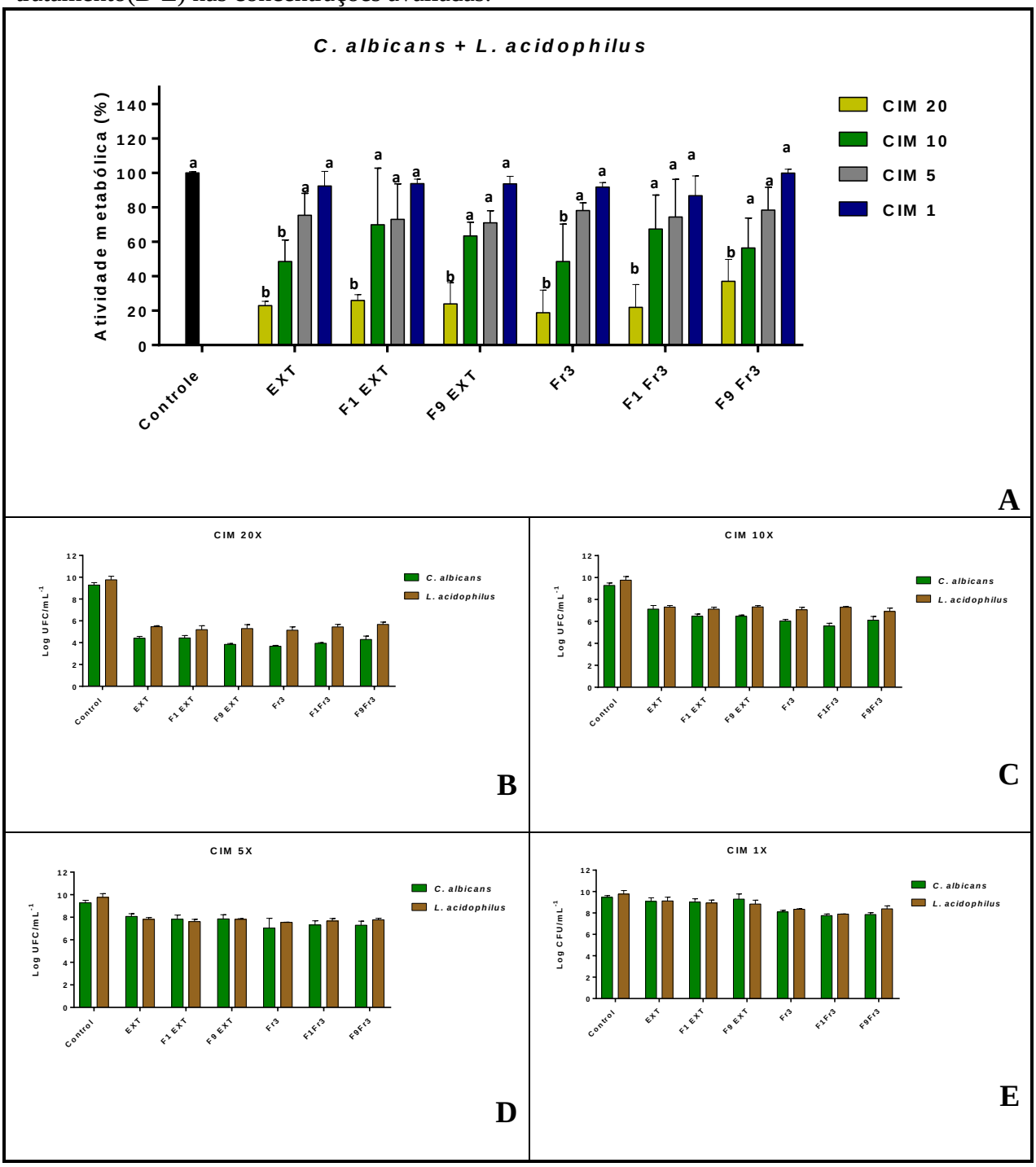
Os dados são apresentados em porcentagem de atividade metabólica através do método de redução do MTT empregando os valores de DO como 100% de atividade. Os tratamentos empregados estão expressos nas concentrações de 20, 10, 5 e 1 vez o valor de CIM obridos sobre células planctonicas de *C. albicans*, bem como o número de UFC/mL obridos após o plaquemamento de cada biofilme na superfície de placas ágar.

Figura 49. Atividade metabólica de biofilmes heterotípicos formados por *C. albicans* ATCC 10231 + *G. vaginalis* BME-1 após o tratamento com os derivados vegetais não incorporados e incorporados nos sistemas de liberação de fármacos pelo método de redução do MTT (A) e a determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC) após o tratamento (B-E) nas concentrações avaliadas.



Valores de CIM= *EXT* (250 µg/mL) , *F1 EXT* (62.5 µg/mL) , *F9 EXT (*62.5 µg/mL), *Fr3* (62.5 µg/mL), *F1 Fr3* (15.6 µg/mL), *F9 Fr3* (15.6 µg/mL). EXT livre = extrato bruto de *S. nitens* não incorporada; F1EXT= extrato bruto de *S. nitens* incorporado na formulação F9EXT= extrato bruto de *S. nitens* incorporado na formulação F9; Fr3 livre = fração 3 de *S. nitens* não incorporada; F1Fr3= fração 3 de *S. nitens* incorporada na formulação F1; F9Fr3= fração 3 de *S. nitens* incorporada na formulação F9. Letras diferentes significam diferença significativa entre os grupos observada através da estatística ANOVA com pós-teste de Tukey com limiar de 0,05. **Fonte:** O autor

Figura 50. Atividade metabólica de biofilmes heterotípicos formados por *C. albicans* ATCC 10231 + *L. acidophilus* ATCC 4356 após o tratamento com os derivados vegetais não incorporados e incorporados nos sistemas de liberação de fármacos pelo método de redução do MTT(A) e a determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC) após o tratamento(B-E) nas concentrações avaliadas.



Valores de CIM= *EXT* (250 µg/mL) , *F1 EXT* (62.5 µg/mL) , *F9 EXT (*62.5 µg/mL), *Fr3* (62.5 µg/mL), *F1 Fr3* (15.6 µg/mL), *F9 Fr3* (15.6 µg/mL). EXT livre = extrato bruto de *S. nitens* não incorporada; F1EXT= extrato bruto de *S. nitens* incorporado na formulação F9EXT= extrato bruto de *S. nitens* incorporado na formulação F9; Fr3 livre = fração 3 de *S. nitens* não incorporada; F1Fr3= fração 3 de *S. nitens* incorporada na formulação F1; F9Fr3= fração 3 de *S. nitens* incorporada na formulação F9. Letras diferentes significam diferença significativa entre os grupos observada através da estatística ANOVA com pós-teste de Tukey com limiar de 0,05. **Fonte:** O autor

Como apresentado na Figura 49, nota-se que os tratamentos sobre os biofilmes compostos por *C. albicans* + *G. vaginalis* foram eficazes, principalmente utilizando as concentrações de 20, 10 e 5 vezes o valor da CIM. A concentração de 1X não reduziu a atividade metabólica dos mesmos. Os valores de UFC evidenciados foram satisfatórios e indicaram que os tratamentos agiram de maneira igualitária sobre ambos os tipos de micro-organismos. Destaca-se ainda as concentrações de 20x (Figura 49 B) e 10 X (Figura 49 C) , as quais promoveram expressiva inibição no numero logaritmo de UFC.

Padrões semelhantes foram encontrados nos experimentos realizados com biofilmes compostos por *C. albicans* + *L. acidophilus* (Figura 50). Entretanto, nota-se que os biofilmes foram menos suscetíveis ao tratamento em comparação aos padrões inibitórios exercidos sobre os biofilmes de *C. albicans.* Os dados obtidos com a quantificação do numero de UFC demonstra o possível motivo desta ação ter se mostrado inferior, uma vez que é possível observar uma discreta superioridade no numero de UFC *de L. acidophilus* em comparação com *C. albicans,* especialmente nos tratamentos utilizando as concentrações de 10X (Figura 50 B) e 20 X (Figura 50 C) o valor da CIM.

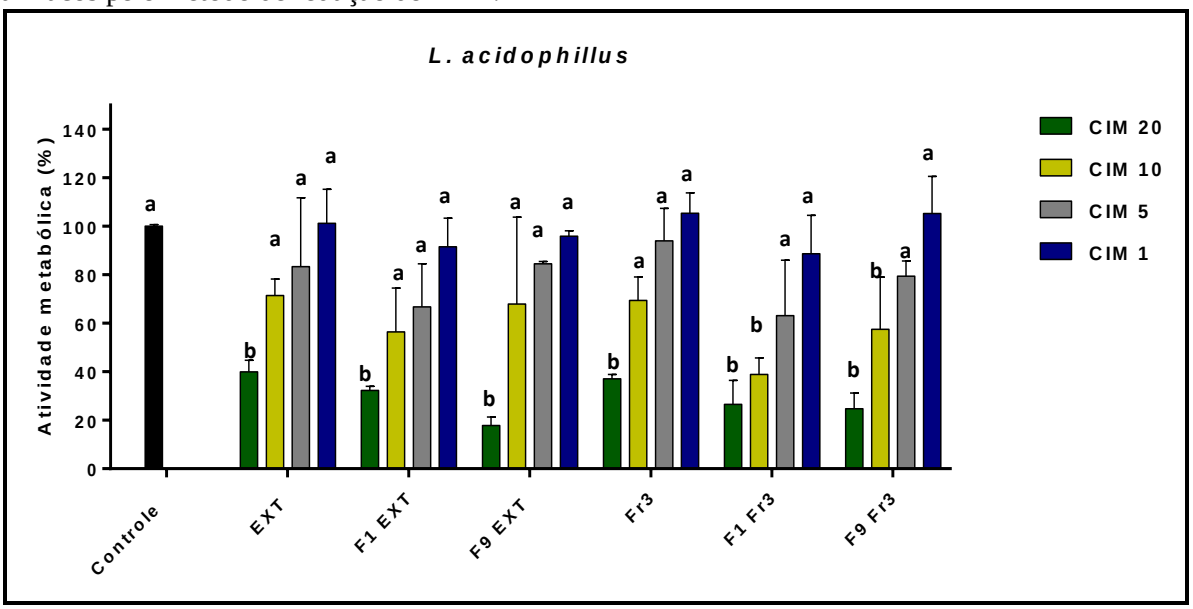
5.7.2.2.2. Atividade sobre biofilmes monotípicos

Afim de fornecer uma abordagem mais concisa referente ao perfil de atividade sobre biofilmes que compõe o ambiente vaginal, a determinação da atividade anti-biofilme relacionados com a CVV teve uma extensão empregando biofilmes monotípicos de cada uma das espécies estudas, as quais compuseram os biofilmes heterotípicos que foram apresentados anteriormente.

As Figuras 51 e 52 apresentam os o perfil antimicrobiano dos derivados vegetais não incorporados (EXT e Fr3) e incorporados na formulação F1 (F1 EXT e F1 Fr3) e F9 (F9 EXT e F9 Fr3) sobre os biofilmes de *L. acidophilus* e *G. vaginalis* respectivamente nas mesmas concentrações avaliadas no ensaio com biofilmes heterotípicos (20, 10, 5 e 1 vez o valor de CIM obtidos sobre células planctônicas de *C. albicans*).

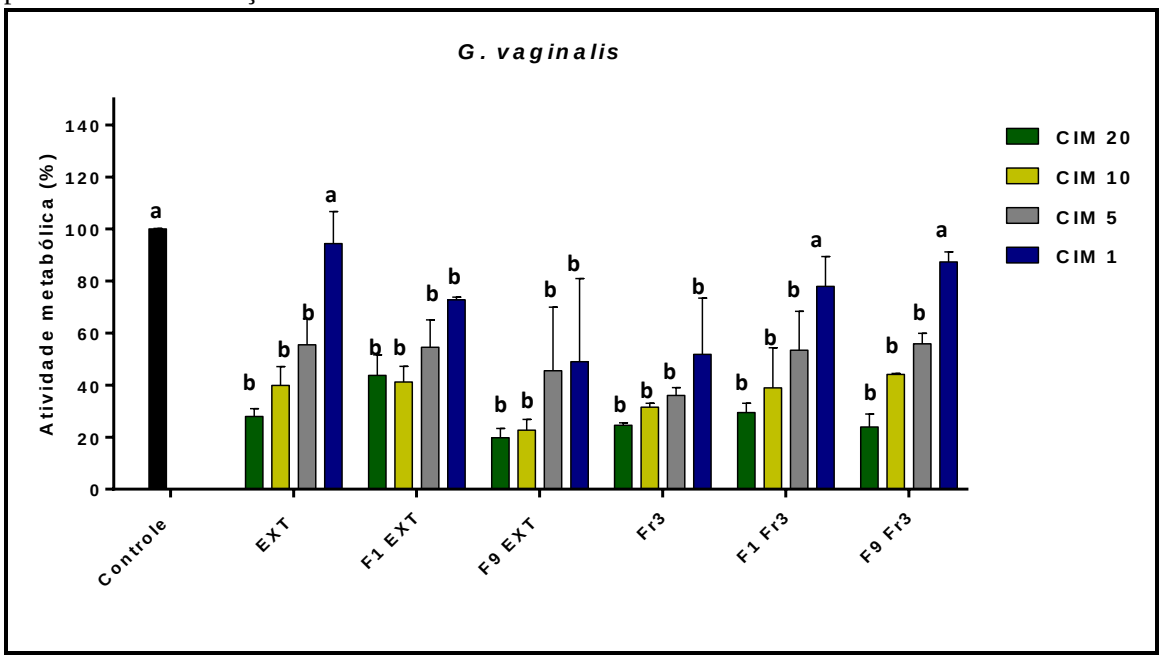
Os dados são apresentados em porcentagem de atividade metabólica através do método de redução do MTT empregando os valores de DO como 100% de atividade.

Figura 51. Atividade metabólica de biofilmes monotípicos de *L. acidophilus* ATCC 4356 após o tratamento com os derivados vegetais não incorporados e incorporados nos sistemas de liberação de fármacos pelo método de redução do MTT.



Valores de CIM= *EXT* (250 µg/mL) , *F1 EXT* (62.5 µg/mL) , *F9 EXT (*62.5 µg/mL), *Fr3* (62.5 µg/mL), *F1 Fr3* (15.6 µg/mL), *F9 Fr3* (15.6 µg/mL); EXT livre = extrato bruto de *S. nitens* não incorporada; F1EXT= extrato bruto de *S. nitens* incorporado na formulação F9EXT= extrato bruto de *S. nitens* incorporado na formulação F9; Fr3 livre = fração 3 de *S. nitens* não incorporada; F1Fr3= fração 3 de *S. nitens* incorporada na formulação F1; F9Fr3= fração 3 de *S. nitens* incorporada na formulação F9. Letras diferentes significam diferença significativa entre os grupos observada através da estatística ANOVA com pós-teste de Tukey com limiar de 0,05. **Fonte:** O autor

Figura 52. Atividade metabólica de biofilmes monotípicos de *G. vaginalis* BME-1 após o tratamento com os derivados vegetais não incorporados e incorporados nos sistemas de liberação de fármacos pelo método de redução do MTT.

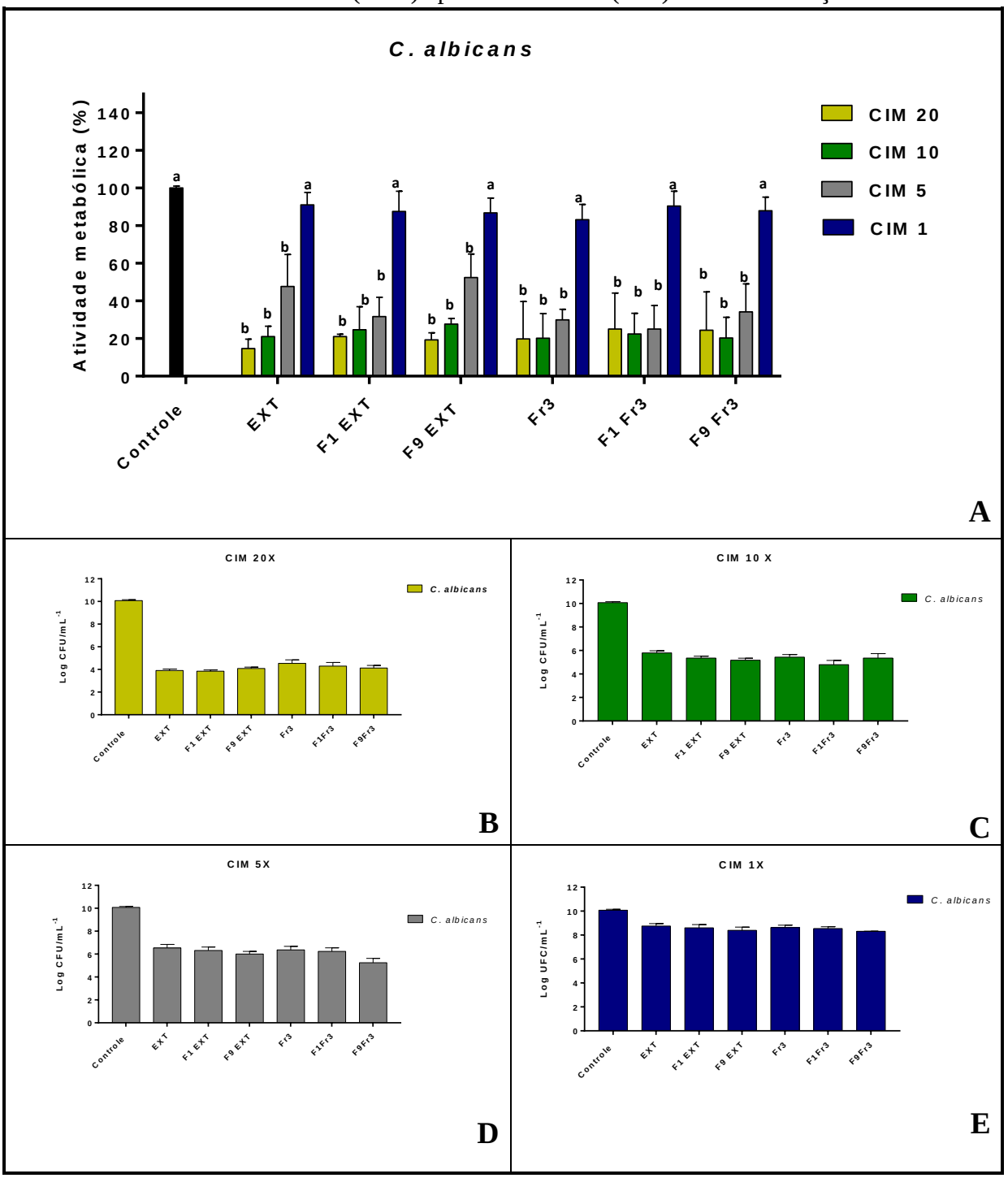


Valores de CIM= *EXT* (250 µg/mL) , *F1 EXT* (62.5 µg/mL) , *F9 EXT (*62.5 µg/mL), *Fr3* (62.5 µg/mL), *F1 Fr3* (15.6 µg/mL), *F9 Fr3* (15.6 µg/mL). EXT livre = extrato bruto de *S. nitens* não incorporada; F1EXT= extrato bruto de *S. nitens* incorporado na formulação F9EXT= extrato bruto de *S. nitens* incorporado na formulação F9; Fr3 livre = fração 3 de *S. nitens* não incorporada; F1Fr3= fração 3 de *S. nitens* incorporada na formulação F1; F9Fr3= fração 3 de *S. nitens* incorporada na formulação F9. Letras diferentes significam diferença significativa entre os grupos observada através da estatística ANOVA com pós-teste de Tukey com limiar de 0,05. **Fonte:** O autor

De acordo com os dados apresentados nas Figuras 51 e 52 nota-se que os tratamentos foram exerceram superior ação sobre os biofilmes de *G. vaginalis* em relação ao de *L. acidophilus* . Estes resultados denotam a ideia de que os tratamentos são mais seletivos para a espécie *C. albicans* .

Para confirmar tal suposição, a Figura 53 apresenta o perfil de atividade sobre biofilmes monotípicos de *C. albicans* e a quantificação do numero de UFC após o tratamento com os derivados vegetais no incorporados e incorporados.

Figura 53. Atividade metabólica de biofilmes monotípicos de *C. albicans* ATCC 10231 após o tratamento com os derivados vegetais não incorporados e incorporados nos sistemas de liberação de fármacos pelo método de redução do MTT (A) e a determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC) após o tratamento(B-E) nas concentrações avaliadas.



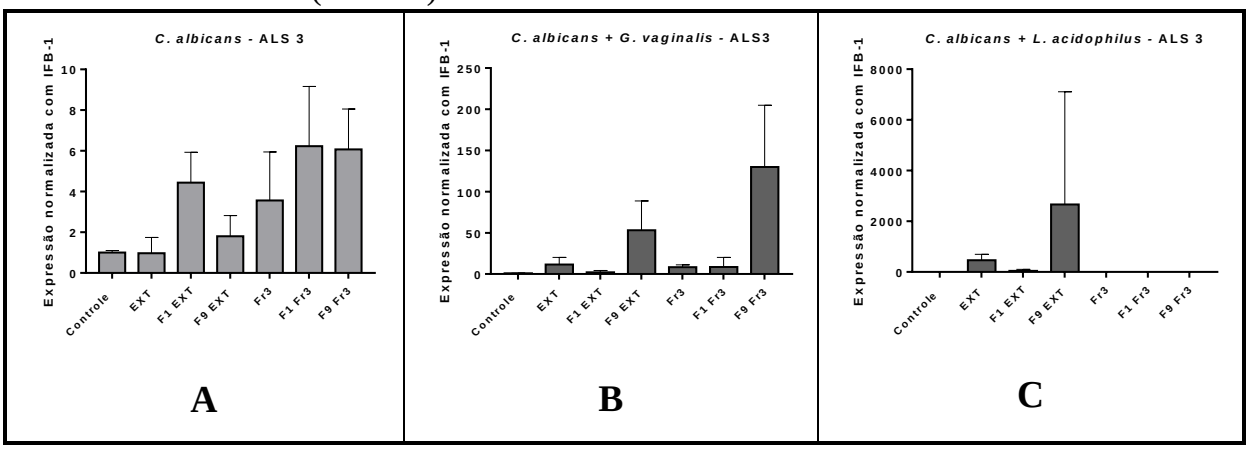
Valores de CIM= *EXT* (250 µg/mL) , *F1 EXT* (62.5 µg/mL) , *F9 EXT (*62.5 µg/mL), *Fr3* (62.5 µg/mL), *F1 Fr3* (15.6 µg/mL), *F9 Fr3* (15.6 µg/mL). EXT livre = extrato bruto de *S. nitens* não incorporada; F1EXT= extrato bruto de *S. nitens* incorporado na formulação F9EXT= extrato bruto de *S. nitens* incorporado na formulação F9; Fr3 livre = fração 3 de *S. nitens* não incorporada; F1Fr3= fração 3 de *S. nitens* incorporada na formulação F1; F9Fr3= fração 3 de *S. nitens* incorporada na formulação F9. Letras diferentes significam diferença significativa entre os grupos observada através da estatística ANOVA com pós-teste de Tukey com limiar de 0,05. **Fonte:** O autor

A Figura 53 mostra claramente que os tratamento foram efetivos contra os biofilmes monotípicos de *C. albicans* e esta ação também é visualizada quando verifica-se o numero de UFC obtido após o plaque amento dos mesmos. Especialmente os tratamentos com as concentrações de 20 x (Figura 53 B), 10 x (Figura 53 C) e 5 x (Figura 53 D) foram promissoras no desempenho da atividade inibitória, uma vez que apresentaram significativo perfil inibitório no numero logaritmo de UFC. Estes dados confirmaram que os tratamentos são mais seletivos para a espécie *C. albicans.*

5.7.3. Análise da influência dos tratamentos sobre a expressão genica de biofilmes maduros

A Figura 54 apresenta os resultados quantificação de expressão do gene ALS3 (associado com adesão) em biofilmes de *C. albicans* (Figura 54 A), *C. albicans + G. vaginalis* (Figura 54 B) e *C. albicans + L. acidophilus* (Figura 54 C).

Figura 54. Quantificação da expressão genica de ALS 3 normalizada empregando o gene de IFB1 como gene de referencia sobre biofilmes maduros tratados com os derivados vegetais não incorporados e incorporados nos sistemas de liberação de fármacos e também sobre os biofilmes não tratados (controle).



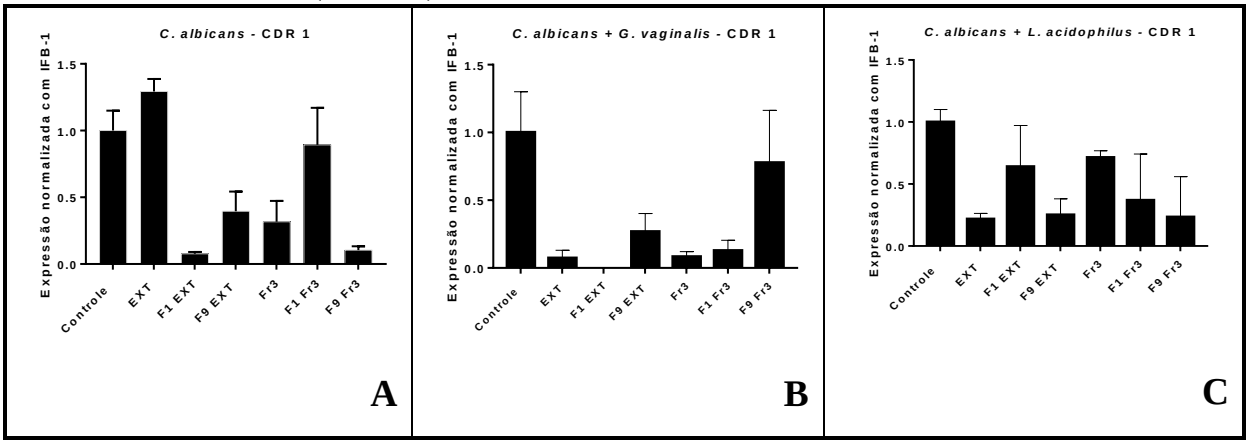
Fonte: O autor

Com base nos dados apresentados na Figura 54 é possível observar que os tratamentos exerceram diferentes interferências na expressão do gene ALS3, uma vez que em alguns casos foi possível observar que a o aumento e/ou diminuição da expressão dos mesmos. Entretanto, nota-se que em biofilmes heterotípicos os tratamentos aumentaram a os níveis de expressão deste gene em comparação com o controle (sem tratamento).

Os estudos relacionados com a quantificação da expressão genica dos genes

responsáveis pela multirresistência em *C. albicans* estão apresentados nas Figuras 55 e 56. As quantificações normalizadas do gene CDR 1 são apresentados na Figura 55 sobre os biofilmes de *C. albicans* (Figura 55 A), *C. albicans + G. vaginalis* (Figura 55 B) e *C. albicans + L. acidophilus* (Figura 55 C).

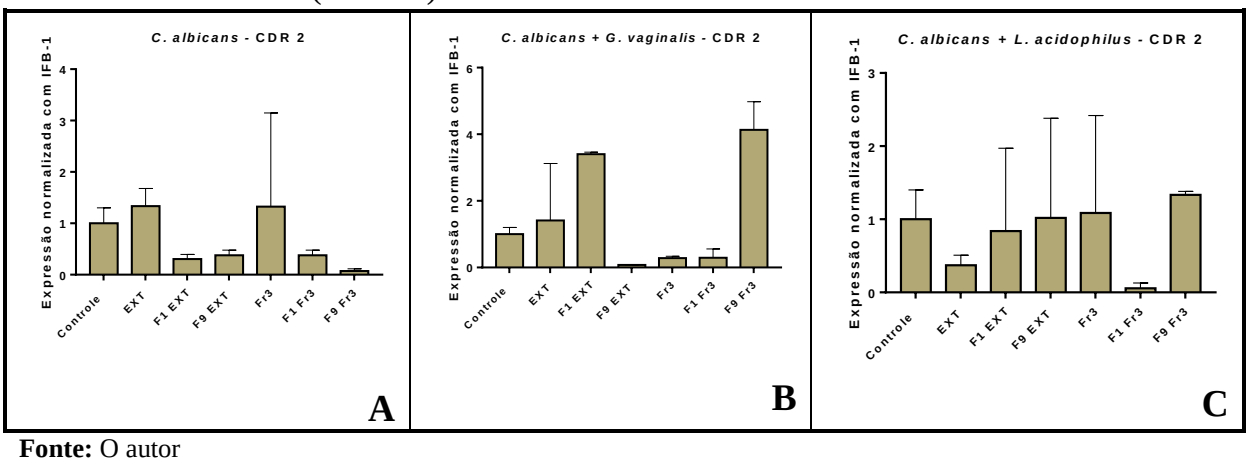
Figura 55. Quantificação da expressão genica de CDR 1 normalizada empregando o gene de IFB1 como gene de referencia sobre biofilmes maduros tratados com os derivados vegetais não incorporados e incorporados nos sistemas de liberação de fármacos e também sobre os biofilmes não tratados (controle).



Fonte: O autor

A Figura 56 apresenta os resultados da quantificação do gene CDR 2 nos biofilmes de *C. albicans* (Figura 56 A), *C. albicans + G. vaginalis* (Figura 56 B) e *C. albicans + L. acidophilus* (Figura 56 C).

Figura 56. Quantificação da expressão genica de CDR 2 normalizada empregando o gene de IFB1 como gene de referencia sobre biofilmes maduros tratados com os derivados vegetais não incorporados e incorporados nos sistemas de liberação de fármacos e também sobre os biofilmes não tratados (controle).

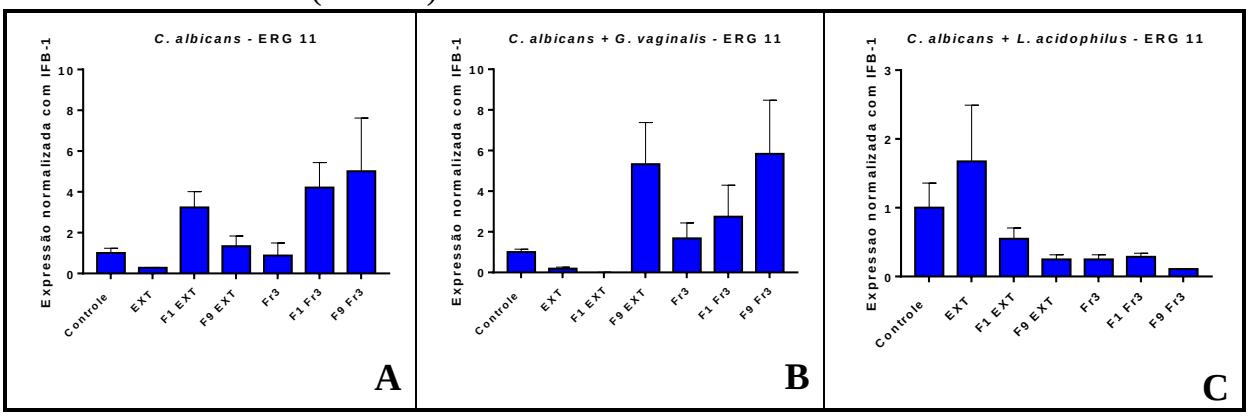


Fonte: O autor

Nos estudos com os genes relacionados com a com a expressão de genes associados com o desenvolvimento da resistência à múltiplos fármacos observa-se que a maioria dos tratamentos foram capazes de inibir a inibição destes genes, especialmente o CDR1, onde foi possível observar que o declínio dos níveis de expressão genica em relação ao controle (sem tratamento).

A Figura 57 apresenta os resultados da quantificação genica da expressão normalizada do gene ERG 11 (associado com a biossíntese de ergosterol) nos biofilmes de *C. albicans* (Figura 57 A), *C. albicans + G. vaginalis* (Figura 57 B) e *C. albicans + L. acidophilus* (Figura 57 C).

Figura 57. Quantificação da expressão genica de ERG 11 normalizada empregando o gene de IFB1 como gene de referencia sobre biofilmes maduros tratados com os derivados vegetais não incorporados e incorporados nos sistemas de liberação de fármacos e também sobre os biofilmes não tratados (controle).



Fonte: O autor

Nos resultados apresentados na figura 57 nota-se que, no geral, os tratamentos promoveram o aumento da expressão de ERG11 nos biofilmes de *C. albicans* e *C. albicans + G. vaginalis* , entretanto, nota-se o declínio dos níveis de expressão nos biofilmes compostos por *C. albicans + L. acidophilus.*

5.8. Ensaios de toxicidade

5.8.1. Determinação do potencial citotóxico *in vitro*

Os resultados referentes ao índice de citotoxidade (IC_{50}) do extrato e fração Fr3 em e não incorporados e incorporados nas formulações F1 e F9 frente às linhagens celulares de HeLa, HaCat e Vero estão apresentados na Tabela 19.

Nota-se que o extrato de *S. nitens* não presentou toxicidade frente à todas as linhagens celulares empregadas na investigação, entretanto, observou-se que a Fr3 apresentou padrões inibitórios distintos entre as linhagens e com valores de IC_{50} inferiores, o que indica padrão de citotoxicidade maior.

Tabela 19. Resultados da determinação do potencial citotóxico *in vitro* (IC_{50}) do extrato metanólico de *S. nitens* e fração 3 não incorporados (EXT e Fr3) e incorporados na formulação F1 (F1 EXT e F1 Fr3) e F9 (F9 EXT e F9 Fr3) sobre diferentes linhagens.

Amostra	IC_{50} (µg/mL)		
	HeLa	**HaCat**	**Vero**
EXT	>500	>500	>500
Fr3	209	80	91
F1 EXT	102	33	30
F9 EXT	79	20	19
F1 Fr3	16	4	5
F9 Fr3	19,8	5	4
anfotericina B	4	4	5

Foi evidenciado que a incorporação nos sistemas de liberação de fármacos promoveu a diminuição dos valores de IC_{50} o que é conferido à toxicidade conferida aos mesmos. A incorporação dos derivados vegetais na formulação F9 mostrou-se mais tóxica em relação à F1. Tal perfil de toxicidade pode ser justificado ao aumento da quantidade de tensoativo neste sistema, uma vez que por estar em maior quantidade pode ter desnaturado a membrana lipídica celular das células utilizadas no estudo.

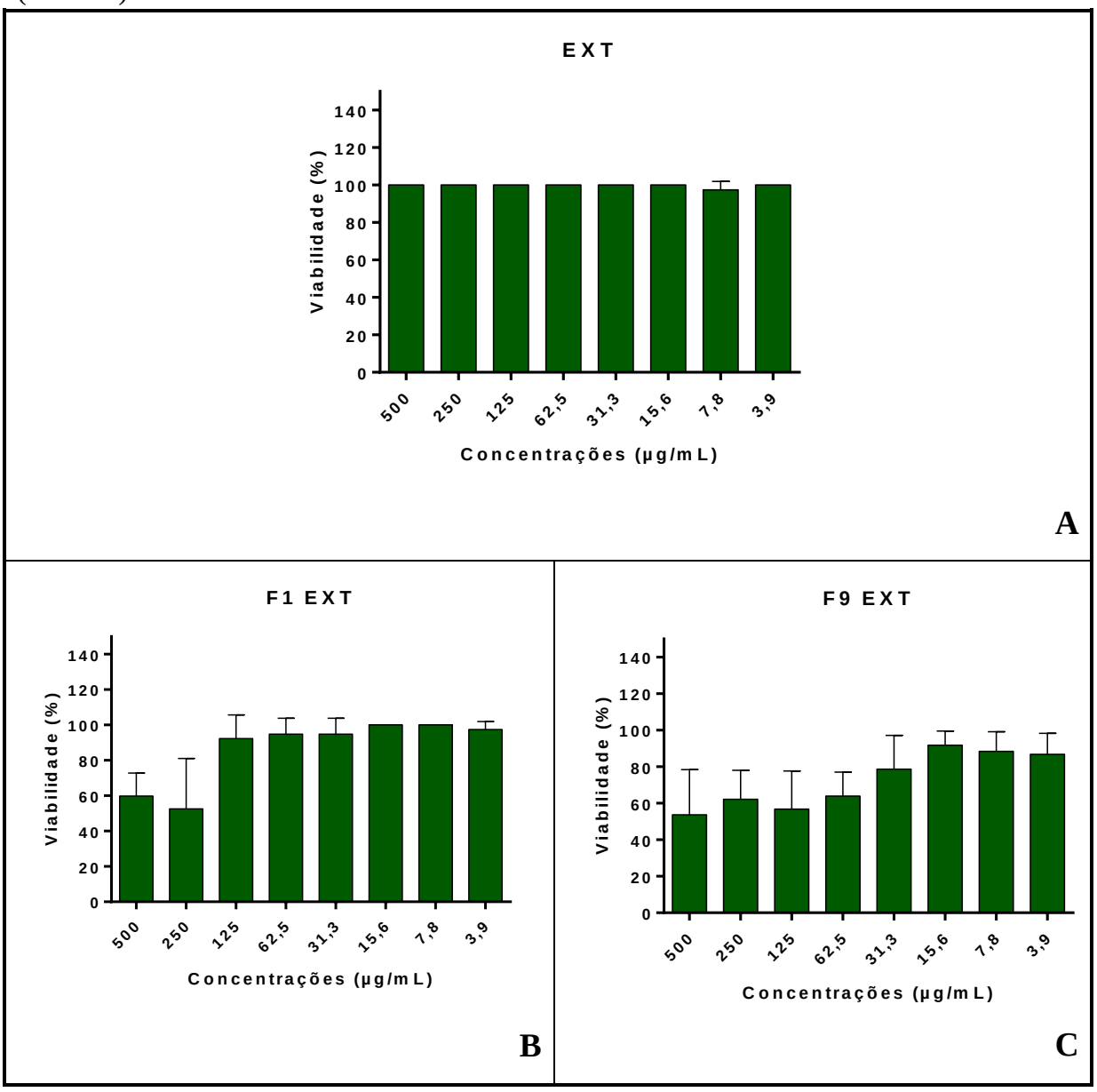
Os resultados aqui reportados mostram-se de grande significância, principalmente quando se compara com os dados de citotoxicidade exercido pela anfotericina B (IC_{50}= 4 e 5 µg/mL), fármaco considerado como "padrão ouro" para o tratamento de infecções fúngicas

causadas por espécies de *Candida* que possuem resistência aos fármacos derivados de azóis

5.8.2. Avaliação da toxicidade *in vivo* em modelo de *Artemia salina*

A Figura 58 apresenta os ensaios de toxicidade em modelo de *Artemia salina* realizado com o extrato metanólico de *S. nitens* não incorporado (EXT) e incorporado nas formulações F1 (F1 EXT) e F9 (F9 EXT).

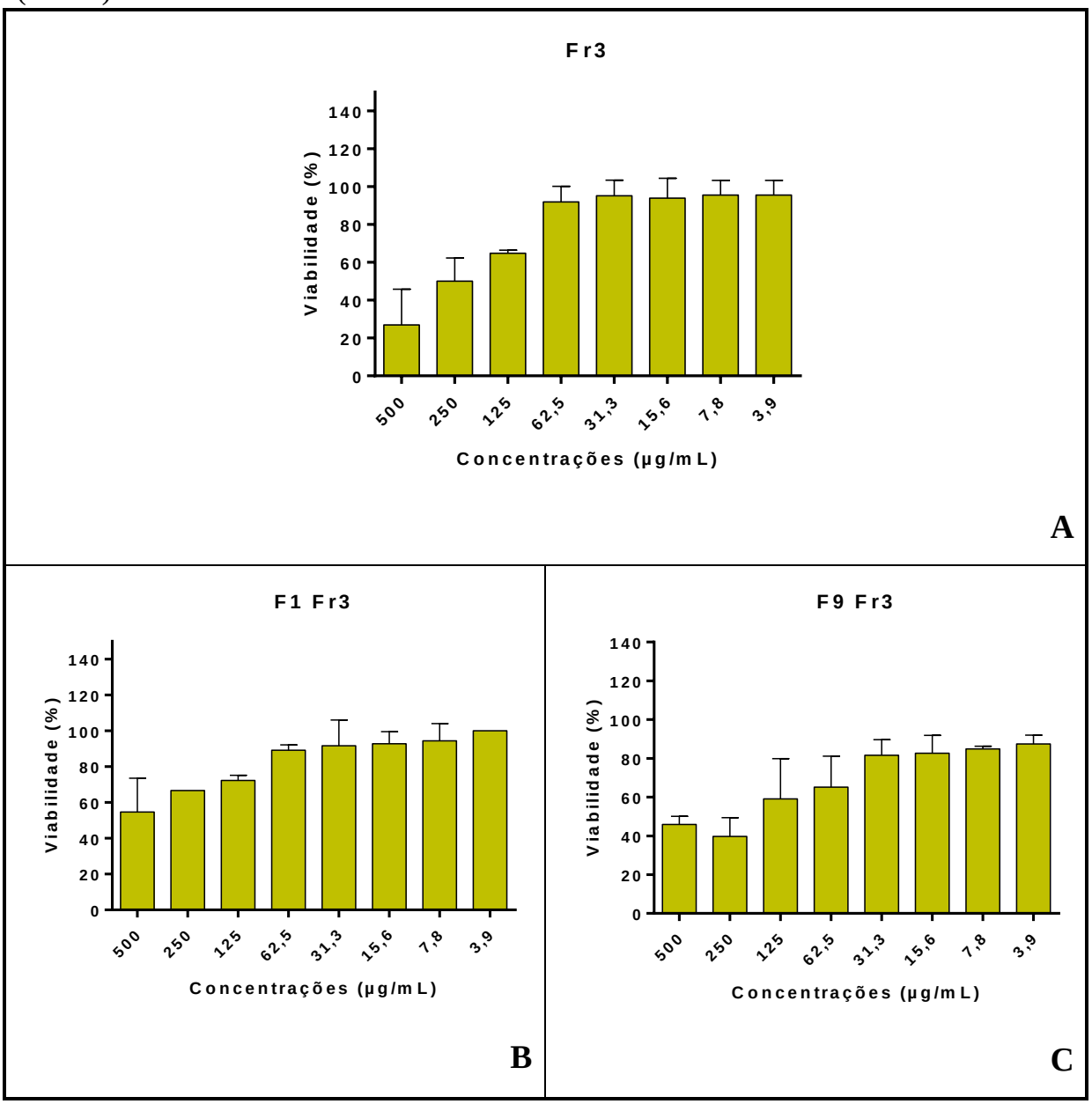
Figura 58. Resultados da analise da toxicidade *in vivo* em modelo experimental de *Artemia salina* empregando o extrato não incorporado (EXT) incorporado em F1 (F1 EXT) e em F9 (F9 EXT)



Fonte: O autor

A Figura 59 apresenta os resultados referentes ao mesmo ensaio de toxicidade realizado com a fração 3 não incorporada (Fr3) e incorporada nas formulações F1 (F1 Fr3) e F9 (F9 Fr3).

Figura 59. Resultados da analise da toxicidade *in vivo* em modelo experimental de *Artemia salina* empregando a fração 3 não incorporada (Fr3) incorporado em F1 (F1 Fr3) e em F9 (F9 Fr3)



Fonte: O autor

Os dados apresentados mostram que o extrato não incorporado (Figura 58. A) não exerceu perfil tóxico sobre as a linhagem de *A. salina*, entretanto, após a incorporação nas formulações F1 e F9 observou-se um declínio na porcentagem de viabilidade da linhagem

empregada (Figura 58. B e C). Embora considerada pequena, esta diferença está diretamente relacionada com a incorporação nos sistemas de liberação de fármacos.

No caso do ensaio com a Fr3 (Figura 59. A) nota-se que a mesma apresentou perfil tóxico decrescente nas concentrações de 500 a 125 µg/mL, todavia, a incorporação em F1 promoveu um declínio deste perfil.

5.9. Avaliação do potencial terapêutico da CVV em modelo experimental *in vivo* de roedores.

A Tabela 20 apresenta os valores referentes ao peso dos animais (g) que constituíram os diferentes grupos experimentais que compuseram o ensaio terapêutico *in vivo* de CVV. Os dados são apresentados através da media ± desvio padrão do peso de cada um dos animais nos dias 0 (confirmação da infecção), e nos dias 2, 4, 6, 8 e 10 (dias de tratamento) e na análise recidiva (RI) de infecção (7 dias após o termino do tratamento).

Tabela 20. Análise do peso corpóreo dos animais que compuseram o experimento in vivo no decorrer do ensaio.

Grupo experimental	Peso (g)						
	Dia 0	***Dia 2***	***Dia 4***	***Dia 6***	***Dia 8***	***Dia 10***	**RI**
Grupo 1	265 ±19,3	338±14,6	416 ±8,6	459±7,9	489 ±8,7	551±16,6	568±9,8
Grupo 2	254±9,4	238±10,4	237±18,7	224±8,3	211±12,6	201±8,2	204±11,3
Grupo 3	289±12,4	278±9,1	260±18,8	221±6,1	222±7,1	254±23,8	292±13,7
Grupo 4	272±15,3	251±8,6	229±10,9	204±12,4	190,5±5,1	194±10,3	203±7,7
Grupo 5	287±10,1	265±14,1	260±5,6	255±5,6	262±3,9	270±7,1	305±10,1
Grupo 6	289±8,0	285±8,7	265±3,9	242±6,3	247±18,6	218±10,3	209±12,9
Grupo 7	265±9,8	258±10,3	260±5,3	241±19,8	232±17,2	208±3,6	316±9,1
Grupo 8	295±5,9	262±4,6	250±10,3	227±5,8	231±11,2	244±9,5	218±2,9
Grupo 9	284±8,6	268±6,1	234±12,5	260±5,7	271±4,6	271±6,1	318±3,9

Grupo1: negativo de infecção, Grupo 2: infectados com *C. albicans*, Grupo 3: infectados com *L. acidophilus*, Grupo 4: infectados com *C. albicans* + *L. acidophilus*, Grupo 5: tratados com creme vaginal de anfotericina B, Grupo 6: tratados com DMSO 20%, Grupo 7: tratados com Fr3 livre, Grupo 8: tratados com a formulação F9 livre, Grupo 9: tratados com fr3 incorporada em F9.

Os resultados referentes a quantificação da carga microbiana no ambiente vaginal dos diferentes grupos experimentais que compuseram o ensaio in vivo de CVV estão apresentados na Tabela 21. Os dados são apresentados através da media ± desvio padrão do peso de cada um dos animais nos dias 0 (confirmação da infecção), e nos dias 2, 4, 6, 8 e 10 (dias de tratamento). A Tabela 22 apresenta os resultados referentes a análise de recidiva de infecção realizada 7 dias após o termino do período de tratamento.

Tabela 21. Resultados da quantificação da carga microbiana vaginal dos animais pertencentes aos diferentes grupos do experimento *in vivo* de CVV.

Grupo experimental	Análises pós-tratamento*											
	Dia 0		*Dia 2*		*Dia 4*		*Dia 6*		*Dia 8*		*Dia 10*	
	AI	UFC/mL*	AI	UFC/mL*	AI	UFC/mL*	AI	UFC/mL*	AI	UFC/mL*	AI	UFC/mL*
Grupo 1	0/0	0±0,00	0/0	0±0,00	0/0	0±0,00	0/0	0±0,00	0/0	0±0,00	0/0	0±0,00
Grupo 2	8/8	5,1±0,10	8/8	5,2±0,10	8/8	5,3±0,010	8/8	5,5±0,10	8/8	5,5±0,05	8/8	5,4±0,11
Grupo 3	8/8	4,9±0,155	4/8	1,9±3,7	0/8	0±0,00	0/8	0±0,00	0/8	0±0,00	0/8	0±0,00
Grupo 4	8/8	4,9±0,10	8/8	5,5±0,10	8/8	5,5±0,10	8/8	5,6±0,11	8/8	5,5±0,10	8/8	5,4±0,10
Grupo 5	8/8	5,0±0,12	8/8	5,2±0,14	8/8	4,8±0,14***	8/8	4,8±0,34***	2/8	1,1±1,24***	0/8	0±0,00***
Grupo 6	8/8	5,1±0,12	8/8	5,3±0,15	8/8	5,5±0,10	8/8	5,5±0,10	8/8	5,5±0,10	8/8	5,4±0,10
Grupo 7	8/8	5,0±0,11	8/8	4,9±0,21*	8/8	4,6±0,27***	8/8	3,23±2,0***	3/8	1,4±2,2***	0/8	0±0,00***
Grupo 8	8/8	5,2±0,12	8/8	5,2±0,10	8/8	5,3±0,10	8/8	5,22±0,10	8/8	5,2±0,10	8/8	5,3±0,10
Grupo 9	8/8	5,1±0,1	7/8	3,8±1,57***	4/8	1,54±2,1***	0/8	0±0,00***	0/8	0±0,00***	0/8	0±0,00***

*Valores expressos em média±desvio padrão do total de UFC (log) obtidas de culturas dos lavados vaginais UFC; AI= numero de animais infectados. Grupo1: negativo de infecção, Grupo 2: infectados com *C. albicans*, Grupo 3: infectados com *L. acidophilus*, Grupo 4: infectados com *C. albicans* + *L. acidophilus*, Grupo 5: tratados com creme vaginal de anfotericina B, Grupo 6: tratados com DMSO 20%, Grupo 7: tratados com Fr3 livre, Grupo 8: tratados com a formulação F9 livre, Grupo 9: tratados com fr3 incorporada em F9. * significa a intensidade da diferença significativa observada através da estatística ANOVA com pós-teste de Tukey com limiar de 0,05.

Tabela 22. Resultados da quantificação da carga microbiana vaginal dos animais pertencentes aos diferentes grupos do experimento *in vivo* de CVV após 7 dias do final do período de tratamento (análise de recidiva de infecção).

Parâmetro	**Grupos experimentais**								
	Grupo 1	**Grupo 2**	**Grupo 3**	**Grupo 4**	**Grupo 5**	**Grupo 6**	**Grupo 7**	**Grupo 8**	**Grupo 9**
UFC/mL	0±0,00	**5,4**±0,11	0±0,00	**5,4**±0,15	0±0,00	**5,3**±0,12	0±0,00	**4,3**±0,18	0±0,00
AI	**0/0**	**8/8**	**0/0**	**8/8**	**0/0**	**8/8**	**0/0**	**0/0**	**0/0**

*Valores expressos média±desvio padrão; AI= numero de animais infectados

De acordo com os dados apresentados na Tabela 21 nota-se que o experimento foi bem sucedido e que os valores de Log de UFC/mL foram satisfatórios para que os aspectos terapêuticos fossem obtidos.

Em relação ao grupo controle positivo de infecção 1 (infectados apenas com *C. albicans* → Grupo 2) e 3 (infectados *C. albicans* + *L. acidophilus* → Grupo 4) nota-se que todos os animais mantiveram-se infectados até o final do experimento e com carga microbiana semelhante, contrariamente ao grupo positivo de infecção 2, qual mostrou-se fraco e com ausência de UFC logo ao quarto dia de análise.

Os grupos 6 e 8 mostraram que tanto o solvente utilizado para solubilizar a Fr3 (DMSo 10%) bem como a a formulacao F9 livre não possuem ação terapêutica, neste sentido, comprova que a ação antifúngica é atribuída ao derivado vegetal vegetal.

O derivado vegetal incorporado no em F9 exerceu perfil de cura logo no quarto dia de tratamento frente aos animais do grupo 9, já aqueles que receberam o mesmo na forma livre não foram considerados curados no décimo dia de análise, igualando-se ao perfil terapeutico desempenhado pelo creme vaginal de com anfotericina B (grupo 5), empregado como controle positivo de tratamento.

6. DISCUSSÃO

Em razão do crescimento exponencial do número de casos de doenças microbianas ocasionados por micro-organismos patogênicos emergentes no cenário clinico, uma grande variedade de estudos referentes a composição química dos derivados de plantas vegetais, que possam ser uteis como antimicrobianos, sempre foi motivo de interesse para a comunidade científica ao longo da evolução humana (NEWMAN; CRAGG, 2016). Neste sentido, a busca por um melhor entendimento da composição química de extratos vegetais oriundos de plantas com potencial farmacológico é um ramo da ciência que contribui muito para o descobrimento de novos compostos com atividade antimicrobiana voltando-se a sua aplicabilidade na terapia de uma ampla gama de doenças.

Neste trabalho empregamos a espécie vegetal *S. nitens* como uma nova estratégia de controle da CVV. Esta planta vem sendo estudada pelo nosso grupo de pesquisa e apresentando resultados satisfatórios no que se diz respeito ao seu potencial antifúngico.

Durante o desenvolvimento do projeto de Mestrado (RAMOS, 2015) do autor desta tese, verificou-se que esta espécie vegetal possui um promissor potencial terapêutico da CVV (RAMOS et al., 2016) bem como um comportamento profilático em um modelo experimental *in vivo* de CVV causada de por *C. krusei* (RAMOS et al., 2015). Estes dados nos estimularam a dar continuidade aos estudos voltados ao controle desta doença bem como a descoberta do composto majoritário deste extrato responsável pela atividade antifúngica observada.

As mais diversas abordagens investigativas de plantas medicinais com propriedades terapêuticas começam com os procedimentos de pré-extração e extração, que é um passo importante no processamento de componentes bioativos de materiais vegetais. Os métodos tradicionais, como a maceração, percolação e extração de Soxhlet, geralmente são ferramentas de extração usadas no pequeno cenário de pesquisa no nível Small Manufacturing Enterprise (NN, 2015).

O estudo foi iniciado com uma nova obtenção do extrato metanólico dos espaços de *S. nitens*, o qual foi coletado na mesma região, seguindo os mesmos parâmetros de coleta, armazenamento e sazonalidade. A metodologia empregada (extração exaustiva por percolação simples) foi a mesma utilizada anteriormente, garantindo assim uma uniformidade da amostra inicial a ser empregada nesta investigação. Nota-se que o procedimento de extração foi satisfatório em termos de rendimento de massa de extrato bruto, o qual mostrou-se 3,33% em relação ao valor da massa inicial de material vegetal (900 g).

O método de percolação apresenta grandes vantagens na obtenção de extratos vegetais. Com esta metodologia é possível trabalhar com quantidades superiores de amostras e consequentemente obter maior massa de extrato, aumentando assim a superfície de contato do solvente extrator com a amostra vegetal (NN, 2015).

A escolha do solvente ideal é uma das etapas mais importantes e cruciais para o sucesso do procedimento extrativo. Existem diversos solventes que podem ser empregados, de acordo com suas características de polaridade e grau de solubilidade (ZAINAL-ABIDIN et al., 2017). Neste estudo foi empregado o metanol (MeOH), um solvente polar amplamente utilizado pela área científica e industrial para proceder a extração de fitoquímicos. Os solventes polares possuem a capacidade de estabilizar os íons através da doação de um próton, formando uma ponte de hidrogénio, bem como através da doação de elétrons não compartilhados (VIZZOTTO; PEREIRA, 2011).

Diversos estudos enaltecem a utilização do MeOH como sendo o solvente mais promissor em processos extrativos, uma vez que possui excelente capacidade de solubilização de compostos, o que se torna ideal para se trabalhar com matrizes complexas como a obtenção de extratos vegetais (SUHAJ, 2006).

Em relação à obtenção de extratos brutos de plantas da família Eriocaulácea, nota-se um extensivo uso desse solvente, adicionalmente, desde os primeiros relatos da composição química de extratos provenientes de *S. nitens*, o MeOH vem sendo o solvente extrator empregado (PACIFICO et al., 2011).

Em um estudo realizado com a espécie *Paepalanthus chiquitensis* Herzog, verificou-se que o metanol foi um excelente solvente para a obtenção de extratos de escapos e capítulos desta planta, o quais mostraram-se satisfatórios e aplicáveis à ensaios cromatográficos que elucidaram a presença, e permitiram o isolamento e quantificação de flavonóides e naftopiranonas (ZANUTTO et al., 2012). Também empregando o MeOH com solvente extrator, foram obtidos extratos de capítulos e escapos de *Paepalanthus giganteus* Sano e *S. nitens* (mesma espécie utilizada neste estudo), os quais foram submetidos à analises quantitativas por cromatografia liquida com detecção de arranjo de fotodiodos fornecendo uma quantificação e elucidação de flavonas, xantonas e naftopiranonas inéditas (ANDREA et al., 2012).

Considerando os promissores resultados obtidos durante o projeto de mestrado, utilizando o metanol como solvente extrator, no presente estudo propomos a realizar um fracionamento biomonitorado afim obter diferentes frações do extrato metanólico de escapos

de *S. nitens* com perfis antifúngicos distintos, das quais, objetivou-se selecionar a mais promissora para aprofundar as investigações relacionadas com o potencial anti-*C. albicans* em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo,* bem como uma monitorização do perfil químico da mesmas a fim de um melhor entendimento do composto responsável pela atividade antifúngica que vem sendo elucidada.

A partir do extrato bruto de *S. nitens* realizamos um fracionamento por extração em fase solida (EFS). A escolha deste método deu-se pela praticidade, possibilidade de aumento da escala do método, bem como a possibilidade de separação de matrizes complexas (BIZIUK, 2006).

A utilização deste método extrativo teve seu auge em meados de 1976, onde surgiu para suprir as desvantagens apresentadas pela extração líquido-líquido e, hoje, consiste no método mais popular de preparo de amostra, sendo utilizada pela maioria dos cromatografistas, uma vez que possibilita um menor consumo de solvente orgânico, prevenção da formação de emulsões, altas porcentagens de recuperação do analito, volumes reduzidos de resíduos tóxicos, capacidade de aumentar seletivamente a concentração do analito e disponibilidade comercial de equipamentos e sorbentes. A utilização de diferentes sorbentes como fase estacionaria possibilita uma melhor adequação dos métodos extrativos, que, em sua maioria, se assemelham aqueles empregados em colunas cromatográficas de fase reversa utilizadas em diversos tipos de CLAE (JARDIM, 2010).

Empregando uma coluna de fase reversa por meio do emprego de sílica C18 como fase estacionária (apolar), foi utilizado como fase móvel diferentes concentrações de MeOH (50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10 e MeOH 100% v/v) para criar-se um gradiente de eluição, o que permitiu uma separação mais concisa dos constituintes presentes no extrato, de acordo com sua característica de polaridade. Ao final da passagem do solvente em contato com a amostra original (extrato bruto) e a fase estacionaria por meio de pressão negativa obtida por meio de vácuo, foram obtidas 12 frações que, ao serem analisadas, confirmaram que o procedimento extrativo por EFS permitiu uma separação satisfatória dos constituintes do extrato, bem como um excelente rendimento total (cerca de 95%), o que permite inferir que praticamente toda amostra depositada foi mantida em contato com o sistema composto pela fase móvel e estacionária.

O primeiro parâmetro investigativo utilizado para verificar o perfil de cada uma das frações obtidas bem como o extrato metanólico foi determinação do perfil cromatográfico por meio da técnica de CCD. Trata-se de uma metodologia muito empregada nos ramos da ciência

que para fornecer parâmetros relacionados com a quantidade de componentes presentes em uma mistura, fornecer a identidade entre dois compostos, bem como promover um panorama geral da constituição química de uma mistura complexa. Todavia, esta metodologia apresenta algumas limitações, tais como a difícil reprodutibilidade dos cromatogramas obtidos, baixa sensibilidade e dificuldade na obtenção dos valores de tempo de retenção (T_R) com precisão e exatidão. Por estas razões, a CCD é considerada como sendo uma metodologia inicial para a elucidação da identidade química de compostos vegetais e animais de maneira geral, e não como um parâmetro confirmatório final, necessitando para isso o emprego de métodos mais sofisticadas como CLAE, entre outros (POOLE, 2003).

Apesar das limitações deste método, a CCD é uma técnica consagrada na área científica e fornece um panorama inicial (mais geral) da composição química de amostras complexas, sendo muito favorável para o início de investigações do perfil de matrizes complexas, o qual foi intuito do emprego da mesma neste trabalho de investigação.

Ao investigar-se a melhor fase móvel para ser empregada nos ensaios de CCD, levou-se em consideração a capacidade desta em permitir uma visualização de bandas individuais retidas na camada adsorvente (sílica C18 sobre placas de alumina) após a eluição da fase móvel durante a corrida total das amostras. Sendo assim, com base nos cromatogramas obtidos com a utilização das seis fases móveis propostas, verificou-se que que o uso de clorofórmio + metanol + água (43:37:20) v/v/v (FM 5) proporcionou um maior desempenho do processo cromatográfico, apresentando bandas isoladas com boa resolução, como é possível observar na Figura 22.

A razão da performance superior da FM5 em relação com as outras FM empregadas pode estar relacionada com a capacidade de interação dos do clorofórmio, agua e MeOH com os diferentes compostos presentes no extrato bruto e frações. O emprego destes três componentes utilizados em conjunto é bem visto pela literatura cientifica da área, principalmente em processos de extração de matérias primas lipídicas proveniente de amostras animais e vegetais.

O primeiro relato da utilização deste sistema foi documentado por Bligh e Dyer, os quais basearam-se na teoria do equilíbrio líquido-líquido dos três componentes. Adicionalmente, os autores afirmaram que a determinação da solubilidade de cada componente pode ser avaliada através de um diagrama ternário de solubilidade de dois líquidos parcialmente miscíveis entre si (clorofórmio e água) com um terceiro (metanol), completamente miscível nos outros dois (BRUM; ARRUDA; REGITANO-D'ARCE, 2009).

Estas afirmações confirmam a suposição de que o uso destes três compostos como fase móvel promoveu interações distintas sobre cada grupamento presentes nas amostras, o que promovei uma separação mais eficaz.

Desde as considerações feitas por Bligh e Dyer, diversos pesquisadores vem empregando fases móveis compostas pela mistura destes solventes em ensaios CCD para a separação de amostras. Recentemente, um estudo que buscou verificar a composição química de fungos endofíticos isolados de partes aéreas *Paepalanthus chiquitensis*, uma espécie vegetal que também pertence à família Eriocaulaceae, empregou uma fase móvel composta por clorofórmio, MeOH, n-propanol e água (5:6:1:4) v/v/v/v nos ensaios de CCD que objetivaram a elucidação de metabólitos secundários produzidos pelo fungo *Fusarium fujikuroi*. Os autores afirmaram que a utilização desta fase móvel promoveu uma separação aceitável e com resolução das cromatoplacas satisfatórias (HILARIO et al., 2017).

Ao analisar os resultados após a revelação com diferentes agentes, sendo eles físico (luz ultravioleta visível com comprimento de onda curto: 254 nm, e longo: 365 nm) e químico (solução de NP-PEG e anisaldeído sulfúrico) notou-se diferentes perfis em cada uma das amostras analisadas.

Empregando o uma solução de anisaldeído sulfúrico (10%) como revelador, verificou-se que a metodologia empregada, bem como a fase móvel, foi capaz de promover a separação dos componentes presentes nas amostras (Figura 22.D). Nota-se a presença de grupamentos de substancias com perfis químicos distintos, bem como a predominância de bandas com coloração amarela, perfil este que pode ser um indício da presença de grupamentos de flavonóides.

O intuído da revelação com o NP-PEG baseou-se na idéia da presença de flavonoides, uma vez que estudos anteriores mostraram a presença dos mesmos no extrato de *S. nitens* (PACÍFICO et al., 2011; CARDOSO et al., 2012). Como resultado, nota-se que todas as amostras analisadas (exceto Fr 6.1) possuem substancias com características de flavonóides uma vez que é possível observar a presença da coloração amarela em todas as amostras adsorvidas na fase estacionaria após a passagem da fase móvel (Figura 22.C). A utilização deste reagente sobre cromatoplacas para fins da elucidação inicial de flavonóides que compõe matrizes complexas é bem visto na literatura científica e fornecem um parâmetro avaliativo satisfatório para tal fim (SHARIF; KITAZ; AL-KAYALI, 2016).

Os resultados obtidos através das análises realizadas empregando luz ultravioleta em comprimentos de onda curto (Figura 21.A) e longo (Figura 21.B) também denotam a ideia da

presença de flavonoides, uma vez que foi verificou-se a absorção da luz emitida em ambos os casos. Estes dados também denotam a ideia de que a maioria amostras vegetais presentes nas cromatoplacas tratam-se de flavonóides, visto que estes compostos possuem grupamentos capazes de absorver luz ultravioleta (visível) em ambos os comprimentos de onda empregados (JULKUNEN-TIITTO et al., 2015). O estudo desenvolvido por Hilário et al. (2017) também empregou os mesmos comprimentos de onda de UV para a visualização de cromatogramas obtidos por CCD.

Sequencialmente aos ensaios de CCD, foi realizado um biomonitoramento do extrato e frações sobre cepas de *C. albicans* com diferentes perfis se susceptibilidade ao fluconazol (ATCC 10231 e CAV3= resistentes, CAS1= sensível) e a cepa de *L. acidophilus* mostrou que todas as amostras apresentam perfis antifúngico e antibacteriano distintos.

De acordo com os resultados expressos na Tabela 5, nota-se que o extrato bruto apresentou atividade antifúngica contra todas as cepas estudas, o que confirma mais uma vez a potencialidade deste composto vegetal em inibir cepas da espécie *C. albicans.* No estudo de Araújo et al., (2013) foi verificado que este extrato foi capaz de inibir cepas padrão (ATCC) e isolados clínicos vaginais de mulheres argentinas portadoras de CVV, constatando-se valores de CIM que variaram de 250 a 31,2 μg/mL. Recentemente, verificamos que este extrato também apresentou atividade anti-*C. albicans* quando empregamos cepas padrão e isolados clínicos com perfil de resistência aos derivados de azóis, os quais isolados de mulheres brasileiras portadoras de CVV. Os valores de CIM encontrados mostraram-se favoráveis variando de 500 a 31,2 μg/mL (RAMOS et al., 2016). Adicionalmente, o perfil antimicrobiano deste extrat também foi verificado contra cepas padrão de clinicas de *C. krusei* (RAMOS et al., 2015), *C. glabrata, C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (RAMOS, 2015).

Em relação ao potencial antimicrobiano das frações, observa-se que as primeiras frações (Fr1 e Fr 1.1) as quais foram obtidas utilizando MeOH+água → 50:50, não apresentaram atividade antifúngica para nenhuma das cepas empregadas na investigação, com relação à antibacteriana, apenas a Fr 1.1 exerceu capacidade inibitória sobre a cepa de *L. acidophilus.*

Este evento pode estar relacionado com o fato de que durante o fracionamento, as primeiras frações recolhidas continham constituintes como gorduras e celulose, e estes tipos de compostos não exercem potencial antimicrobiano. A característica física das mesmas mostrou-se mais oleosa, com brilho, e com aspecto pastoso sólido, sendo estes um indício da

presença destes compostos nestas amostras. Observa-se que um promissor padrão inibitório foi observado quando as frações Fr2, Fr2.1, Fr3, Fr3.1, Fr4, Fr4.1, Fr5 e Fr5.1, especialmente sobre as cepas de *C. albicans,* o que indica que após a retirada dos compostos mais apolares (gorduras) os constituintes ativos foram recolhidos de maneira mais eficaz.

Em relação às frações Fr6 e Fr6.1, não foi observado atividade antimicrobiana na faixa de concentração avaliada (CIM >1000 μg/mL) para a maioria das cepas, exceto apenas no caso da Fr6, a qual foi capaz de promover a inibição de *C. albicans* CAS 1 na concentração de 1000 μg/mL.

Estes resultados mostram que o fracionamento foi capaz e dividir os constituintes presentes no extrato bruto, o qual é ativo, em amostras mais puras e com perfil de atividade superior. Os valores de CIM obtidos são promissores e classificam as frações e o extrato como possuidores de atividade antimicrobiana satisfatória. Estes são os primeiros relatos na literatura que elucidam o fracionamento biomonitorado do extrato metanólico de escapos de *S. nitens* na prospecção inibitória de *C. albicans*.

Diferentemente dos fármacos sintéticos e padronizados para terapia antimicrobiana, tais como anfotericina B, fluconazol e derivados da penicilina, a comunidade científica e publicações da área microbiológica não apresentam uma classificação consensual em relação aos valores de CIM obtidos em pesquisas relacionadas com o potencial inibitório de derivados vegetais. Em um estudo realizado em 2001, foi considerado como inibidores potentes com valores de CIM iguais ou menores que 500 μg/mL; valores entre 600 e 1500 μg/mL como inibidores moderados e acima de 1600 μg/mL como inibidores fracos (ALIGIANNIS et al., 2001). Em 2008, Webster e colaboradores estabeleceram os valores de CIM igual ou menor que 1000 μg/mL como sendo satisfatórios durante um screening de produtos naturais com potencial antifúngico (WEBSTER et al., 2008). Seguindo as mesmas considerações de Webster et al., o estudo desenvolvido por Galucci e colaboradores também considerou como promissores compostos inibitórios de cepa de *Candida* sp. concentrações de CIM inferiores a 1000 μg/mL (GALLUCCI et al., 2014). Neste sentido, os resultados reportados nesta investigação mostram-se promissores e de grande aplicabilidade.

Em 2014, um estudo empregando a espécie vegetal *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers obteve um perfil semelhante ao observado nesta investigação. Neste trabalho os autores obtiveram o extrato vegetal a partir das flores desta espécie, o qual foi fracionado em 9 frações e submetidas a um biomonitoramento utilizando cepas de *C. albicans, C. krusei, C.*

tropicalis, C. parasilosis e *C. guilhermondii.* Os resultados desta investigação mostraram que o fracionamento foi capaz de concentrar os constituintes mais ativos do extrato vegetal em duas principais frações, as quais apresentaram valores de CIM menores quando comparado com o extrato bruto.

Um estudo recente realizou o fracionamento do extrato de folhas de *Myrcia tomentosa* (Aubl.) DC e avaliou por meio de um biominotamento utilizando 15 cepas bacterianas de diferentes espécies e 12 cepas de *Candida* spp. a fim de elucidar as frações mais ativas que levassem ao composto ativo responsável pela atividade antimicrobiana do extrato vegetal.

Assim como neste estudo, os autores observaram que o fracionamento promoveu a separação e purificação e componentes ativos presentes no extrato bruto, além disso, os resultados deste comprovam a atividade antifúngica do extrato etanólico de *M. tomentosa* e suas frações e mostraram que o flavonoide quercetin-3-O-a-arabinofuranose (avicularin) é o principal responsável por esta atividade biológica e potencial fonte de novas alternativas antifúngicas (SILVA SA, et al., 2017).

O biomonitoramento de frações oriundas de extratos vegetais empregando ensaios biológicos que objetivam a terapia pretendida é uma excelente estratégia para que a elucidação de componentes ativos seja aplicável à terapia de doenças em geral. No estudo desenvolvido por Casanova e colaboradores (2014) foi realizado um fracionamento biomonitorado do extrato das folhas de *Ocimum gratissimum* no qual foi estabelecido pela primeira vez uma correlação a atividade hipoglicêmica de derivados desta espécie vegetal e sua composição química por meio de um fracionamento biomonitorado. Os resultados obtidos sugeriram uma possível interação entre o ácido chicórico e uma substância presente no precipitado a partir da fração aquosa (CASANOVA et al., 2014).

Destaca-se ainda que, dentre todas as frações, a amostra Fr3 apresentou o melhor perfil antimicrobiano frente todas as cepas empregadas, especialmente sobre as linhagens de *C. albicans.* Em vista deste promissor perfil antimicrobiano, esta amostra foi eleita como a mais promissora da investigação e escolhida para que as triagens biológicas posteriores fossem realizadas.

Tendo em vista os resultados dos ensaios de CCD e a avaliação biomonitorada, os quais mostraram que existem diferenças entre as amostras obtidas, em termos químicos e biológicos, uma analise por CLAE-DAD foi iniciada para que fosse possível evidenciar os perfis cromatográficos das mesmas. Esta etapa da investigação objetivou avaliar de uma maneira mais precisa as características atribuídas a cada uma das amostras qua apresentaram

atividade antimicrobiana (EXT, Fr2, Fr2.1, Fr3, Fr3.1, Fr4, Fr4.1, Fr5 e Fr5.1)

Este experimento baseou-se em um gradiente empregando uma coluna Thermo Hypersil Gold aQ® C18 (250 x 4,6 mm; 5 μm), e como fase móvel, uma mistura de metanol: água utilizando um gradiente exploratório, sendo de 5-100% de metanol por 50 min, seguido de metanol por 10 min com vazão de 1,0 mL/min. Adicionalmente, empregou-se quatro diferentes comprimentos de onda (220, 250, 300 e 350 nm) para que assim fossem selecionados o melhor em termos de resolução.

Ao final da análise dos cromatogramas obtidos, o comprimento de onda de 350 nm foi selecionado para apresentar os resultados neste documento, uma vez que forneceu uma leitura mais satisfatória apresentando maior número de picos e maior absorbância das substâncias dentre os quatro comprimentos de onda analisados.

No cromatograma apresentado pela Figura 23 é possível verificar que o extrato bruto apresenta picos relativamente simples e com boa resolução, entretanto, observando os cromatogramas das frações nota-se que se tratavam de picos sobrepostos, os quais foram separados com o fracionamento. Estas informações podem ser constatadas comparando o cromatograma do extrato e as frações.

De acordo com os cromatogramas (CLAE-DAD) das frações ativas apresentados nas Figuras de 24 a 27, nota-se que todas as amostras possuem perfis cromatográficos distintos. Confirmando os resultados que foram elucidados nos experimentos de CCD o que confirma os resultados apresentados na análise por CCD. Estas diferenças de perfis estão diretamente relacionadas com o resultado das análises encontradas na determinação da CIM frente às cepas fúngicas e a cepa bacteriana, uma vez que se obteve padrões inibitórios distintos. Estes dados confirmam que o perecimento de extração em fase sólida é uma técnica eficaz que pode separar grupamentos de compostos com diferentes características químicas e biológicas (ANDRADE-EIROA et al., 2016).

Ao final das análises previamente descritas, o estudo foi direcionado para o aprofundamento das analises químicas empregando a fração mais ativa de acordo com o biomonitoramento realizado (Fr3) bem como o extrato bruto. Para tal fim, o método cromatográfico desenvolvido por Pacífico et al. (2011) foi empregado para a realização destas analises. Neste estudo foram realizados experimentos que elucidaram além do perfil cromatográfico do extrato bruto, a presença de 17 substâncias isoladas, dentre elas a 3,6-dimetoxi-1,5,7-tri-hidroxixantona e a luteolina. As considerações feitas por estes pesquisadores forneceram uma base sólida para que uma análise mais concisa fosse

desenvolvida no presente estudo.

Na nova análise do extrato bruto é possível observar a presença de 9 picos de interesse no cromatograma obtido (Figura 28). A análise dos espectros no UV dos picos 1 a 9, em comparação com dados da literatura confirmam que estas substâncias são flavonoides derivados da luteolina (Pacifico et al., 2011). Uma vez que o pico 2 apresenta duas bandas sendo uma em 250 nm referente a Banda II de flavonoides e outra em 350 nm, referente a Banda I (MABRY, et al., 1970).

Estes dados vão de acordo com os resultados apresentados por estudos que avaliaram a composição química de *S. nitens.* O estudo de Cardoso et al. (2012) avaliaram a composição química deste extrato e constataram a presença de flavonóides em sua composição, dentre eles a luteína, a qual está presente no extrato metanólico de capítulos e escapos de *S. nitens*, além destes, foi encontrada a 3,6-dimetoxi-1,5,7-tri-hidroxixantona está presente apenas no extrato metanólico dos capítulos, confirmando as considerações feitas por Pacífico. Além destes compostos, ambos os estudos elucidaram a presença de outras substâncias, tais como apigenina e seus derivados, flavonas *O*-glicosiladas, dentre outros compostos fenólicos.

Estes dados mostram que o extrato metanólico de *S. nitens* é ricamente constituído por metabolitos secundários que possuem atividade antimicrobiana comprovada em diversos estudos disponíveis no repositório científico a nível mundial (NEWMAN; CRAGG, 2016), o que confirma os resultados referentes ao seu potencial antimicrobiano quem vem sendo elucidado ao longo dos anos de pesquisa com esta planta.

Em relação à Fr3, foi observado que a mesma possui apenas 3 picos no cromatograma obtido após o emprego do novo método cromatográfico (Figura 29) sendo o majoritário o pico 2 (T_R= 20,00 min). Os espectros de absorção no UV mostraram bandas com perfil característico de flavonóides nos três picos encontrados, especialmente no 2.

Adicionalmente, comparando o perfil cromatográfico desta fração com o do extrato metanólico dos escapos de *S. nitens* desenvolvido por Pacífico et al. (2011) notou-se que podiam tratar-se das substâncias luteolina (pico majoritário → 2) e de seus derivados, neste sentido o padrão luteolina (3',4',5,7-tetraidroxiflavona) Sigma® (pureza ≥ 98%) foi empregado na investigação e analisado pelo mesmo método cromatográfico ao qual a Fr3 foi submetida.

Ao analisar o cromatograma do padrão luteolina (Figura 30) é possível ver com clareza a presença de um pico único e isolado, o que garante a presença de apenas uma substancia pura, bem como a presença de bandas obtidas pela absorção do espectro de UV

também características de flavonóides. Em relação ao tempo de retenção do pico da luteolina, nota-se que foi o exatamente o mesmo que o pico majoritário (pico 2) da fração Fr3 (T_R= 20,00 min). Esta semelhança fortaleceu a suposição de que ambos os picos se tratavam das mesmas substâncias, a qual foi a razão para que uma nova análise utilizando uma mistura da solução de Fr3 e padrão luteolina fosse realizada nas mesmas condições.

Os dados expressos na Figura 31 apresentam três diferentes cromatogramas, referentes a este ensaio. No cromatograma A tem-se a Fr3 apresentando três picos, no entanto a superioridade do pico 2 em relação ao 1 e 3, entretanto, o cromatograma B apresenta a luteolina pura, no qual é possível observar o pico isolado. Ao co-injetar as duas amostras (cromatograma C) foi evidenciado um aumento da intensidade do pico 2, o qual foi ocasionado pela adição da luteolina pura à Fr3, sendo assim, este resultado confirmou que o pico majoritário da Fr3 é o flavonóide luteolina.

No estudo de Pacífico et al. (2011) foi evidenciado que a luteolina foi um dos flavonóides encontrados exclusivamente no extrato metanólico dos escapos de *S. nitens*, a qual está apresentada no pico 17 do cromatograma apresentado pela Figura 32.

A razão pela qual a atividade antimicrobiana da Fr3 foi superior à do extrato pode ser explicada no cromatograma da Figura 33, onde é possível observar que o fracionamento por EFS foi capaz de concentrar o luteolina presente no extrato bruto na Fr3. Por meio deste cromatograma, qual apresenta a sobreposição entre os dois compostos, nota-se que existe uma superioridade de luteolina (representado pelo cromatograma rosa) em relação ao cromatograma do extrato (representado pelo cromatograma azul). Esta informação garantiu a fidedignidade dos resultados encontrados nesta etapa da investigação, uma vez que se tratam dos mesmos extratos vegetais.

Os flavonóides compreendem um grande grupo de metabólitos secundários de plantas caracterizados por uma estrutura de difenilpropano (C6-C3-C6). Eles são amplamente distribuídos em todo o reino das plantas e são comumente encontrados em frutas, vegetais e certas bebidas. Numerosos estudos pré-clínicos e alguns estudos clínicos sugerem que os flavonóides têm potencial para a prevenção e o tratamento de várias doenças. Alguns estudos epidemiológicos apoiam um papel protetor de dietas ricas em alimentos com flavonóides e um risco reduzido de desenvolver câncer e doenças cardiovasculares (LÓPEZ-LÁZARO, 2009).

Uma das funções incontestáveis atribuído à presença de flavonóides na constituição das plantas é a sua capacidade de proteção contra micro-organismos. Isso envolve sua presença nas plantas como agentes constitutivos, bem como sua acumulação como

fitoalexinas em resposta ao ataque microbiano. Devido a este papel protetor, não é surpreendente que as plantas ricas em flavonóides tenham sido usadas por muitos anos em medicina tradicional para tratar doenças infecciosas (RUSSELL; DUTHIE, 2011). A Literatura científica mostra resultados promissores de plantas medicinais com potencial antimicrobiano e atribui este perfil principalmente à presença de flavonóides em sua composição (CUSHNIE; LAMB, 2005).

De acordo com Seleem e colaboradores (2017) estrutura geral das flavonas baseiam-se em uma estrutura de ceto-grupo na posição C4 e uma ligação dupla entre C2 e C3. As flavonas de ocorrência natural incluindo a luteolina (3,4,5,7-tetrahidroxiflavona) possuem atividade antimicrobiana, no qual o mecanismo de ação implicado neste grupo de compostos é mediado através da inibição de bombas de efluxo, o que, em última instância, resulta na indução de morte celular ou apoptose (SELEEM; PARDI; MURATA, 2017)

A atividade antimicrobiana da luteolina é conhecida pela literatura científica da área, a qual apresenta estudos promissores empregando este flavonóide no controle de micro-organismos patogênicos (LÓPEZ-LÁZARO, 2009). Visto a esta capacidade, o uso deste componente vegetal desperta interesse distintos para o controle de uma ampla gama de infecções microbianas. Em 2012 um estudo empregando a espécie vegetal *Delonix elata* foi verificado que a luteolina é o constituinte ativo do extrato de folhas, adicionalmente, os autores realizaram modificações em sua estrutura empregando para promover a inibição da enzima GlcN- 6-P sintase, como resultado, os autores mostraram que a luteolina promoveu uma notável atividade antibacteriana através da inibição desta enzima um dos possíveis mecanismo de ação deste flavonóide frente aos micro-organismos empregados neste estudo (PRADEEPA et al., 2012).

No estudo desenvolvido por Shafaghat e colaboradores (2014), empregando o extrato metanólico de *Achillea tenuifolia* Lam. foi realizado um fracionamento por EFS e por meio deste foram isolados metabolitos secundários com potencial antimicrobiano, dentre eles a luteolina e alguns derivados. Os autores mostraram que estas substancias foram capazes de inibir o crescimento dos micro-organismos empregados na investigação classificaram a luteolina como um promissor flavonóide antibacteriano (SHAFAGHAT; PIRFARSHI; SHAFAGHATLONBAR, 2014).

Em 2016, um estudo verificou que a luteolina (mesmo padrão comercial utilizado neste estudo) foi ativa contra cepas clínicas e padrão de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticiclina, além de apresentar-se como um agente sinérgico no aprimoramento da atividade

antibacteriana de fármacos inativos contra as cepas empregadas (JOUNG et al., 2016).

O trabalho desenvolvido por Candiracci e colaboradores objetivou verificar a capacidade anti-*C. albicans* de um extrato de mel italiano rico em flavonóides. Neste estudo foi verificado que a luteolina é o composto majoritário de frações isoladas do extrato o qual apresentou capacidade de inibir a conversão dimórfica de *C. albicans* e afirmaram que este efeito está ligado ao suporte do nível de glutationa intracelular, cuja alteração desempenha um papel significativo na conversão de levedura em hifa, por intermédio da inibição da geração de espécies reativas de oxigênio durante a formação de tubos germinativos os quais são reesposáveis pelo inicio do desenvolvimento de hifas, estruturas estas que classificam-se como uma dos principais fatores responsáveis pela patogenicidade desta espécie fúngica (CANDIRACCI; CITTERIO; PIATTI, 2012) .

Ao investigarmos a atividade antimicrobiana da luteolina pura contra as cepas empregadas neste estudo verificamos que este composto foi ativo contra todas as cepas da investigação (Tabela 6). Tendo em vista estes resultados, pode-se confirmar que atividade antimicrobiana apresentada pela Fr3 é devido à presença da luteolina em sua constituição.

De maneira geral, a atividade antimicrobiana da luteolina sempre foi apreciada pela literatura científica e sua capacidade de inibir e combater micro-organismos patogênicos é conhecida. Entretanto, a utilização deste composto para o tratamento de doenças causadas por fungos é considerado escasso em comparação às pesquisas que visam o controle de doenças causadas por bactérias. Adicionalmente, a literatura não dispõe de estudos empregando a luteolina ou frações ricas por sua composição em ensaios *in vitro* e/ou *in vivo* voltando-se à terapia da CVV, o que garante o ineditismo e importância dos resultados apresentados neste documento. Além do mais, os resultados desta investigação tratam-se dos primeiros relatos da utilização de frações de *S. nitens* contra cepas de *C. albicans*.

Uma vez que a estratégia principal deste trabalho se volta à prospecção terapêutica de derivados de *S. nitens* durante eventos de CVV, aplicamos a nanotecnologia farmacêutica como uma ferramenta para veiculação destes compostos vegetais, bem como exercer a capacidade de potencializar a ação destes compostos, o que gera maior desempenho terapêutico e diminuição das dosagens necessárias para promover a atividade antimicrobiana pretendida.

Neste trabalho foi desenvolvido uma nanoemulsão lipídica constituída por polioxietileno 20 cetil éter (Brij® 58) como tensoativo, colesterol como fase oleosa e uma dispersão de quitosana (0,25%) em tampão fosfato pH 7,4 e como fase aquosa. A escolha

destes componentes levou em consideração a baixa viscosidade que conferem ao sistema, biocompatibilidade, possibilidade de interação dinâmica com a parede celular do micro-organismo e possibilidade de administração vaginal dos componentes, além de apresentarem-se com baixos efeitos tóxicos para células humanas (STIDDER et al., 2005).

O polioxietileno 20 cetil éter (Brij® 58) é um tensoativo não iônico que apresenta equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) de 15,7. Este tensoativo foi utilizado para obtenção de sistemas nanoestruturados empregando diferentes fases oleosas, como óleo mineral e ácido oleico. Além disso, apresenta baixa toxicidade e há relato na literatura de sua utilização em formulações para uso vaginal (SALJOUGHI et al., 2013; BONIFÁCIO et al., 2015).

Como fase oleosa do sistema, empregou-se o colesterol, um lipídeo de cadeia longa que é o principal esterol presente no corpo humano apresentando-se como componente estrutural das membranas celulares e das lipoproteínas plasmáticas (SOLOMONS e FRYHLE, 2001). A literatura menciona o efeito do colesterol como fase oleosa nas propriedades estruturais e termodinâmicas de microemulsões lipídicas e também para uso oral (ARAMAKY et al., 1993; STIDDER et al., 2005).

A escolha do colesterol como fase oleosa deste sistema de liberacao baseu-se na possibilidade de conferir uma maior afinidade com o ergosterol presente na membrana da célula fúngica, o que pode acarretar em maior ação dos ativos quando incorporados no sistema nanoestruturado, uma vez que este pode formar poros artificiais na membrana celular do micro-organismo, alterando a permeabilidade seletiva a cátions e levando-o à morte celular, ou seja, à lise coloidal osmótica devido ao fluxo iônico exacerbado (ANGELOVA e SCHMAUDER, 1999; COHEN, 1998).

Já como fase aquosa, optou-se por empregar uma dispersão de quitosana em meio ácido (ácido ácido acético 1%) juntamente com tampão-fosfato 50 mmol L^{-1} pH 7,4, uma vez que há relatos na literatura de que a adição de tampões e/ou agentes isotonizantes na fase aquosa permitem a manutenção de um pH favorável, garantindo a estabilidade do princípio ativo (SILVA et al., 2001).

A quitosana é um polissacarídeo que é classificada como um co-polímero de glucosamina e N-acetil glucosamina. Sendo biodegradável e biocompatível, este composto tem sido usado na formulação de sistemas de liberação de fármacos para promover uma liberação prolongada do fármaco (SALMAZI et al., 2015). A quitosana tem sido largamente investigada como um veículo de fármacos para muitas vias de administração, e isso se dá pela mesma possuir propriedades biológicas favoráveis, tais como a não toxicidade,

biocompatibilidade, biodegradabilidade, além de características antibacterianas. (MITRA e DAY, 2011). Relatos na literatura mostra a utilização deste componente como parte de sistemas de liberação de fármacos empregados para administração vaginal de compostos bioativos (SILVA et al., 2014).

Com base no diagrama de fases ternário presentado na Figura 34 é possível verificar que diferentes quantidades de cada um dos constituintes foi capaz de originar 36 formulações. Observou-se que apenas uma formulação com característica líquido transparente, onde há baixa concentração de fase oleosa (10%) e tensoativo (10%); formulações com característica viscosa opaca (8) apresentaram-se na região inferior do diagrama com concentração de 20-60% de fase oleosa e 10-20% de tensoativo; formulações viscosas transparentes (10) mostraram-se em regiões que continham 20-60% de tensoativo e 10-30% de fase oleosa; formulações viscosas semitransparentes (3) apresentaram-se na região superior do diagrama onde continha 10-20% de fase oleosa e 70-80% de tensoativo; por fim, as formulações que apresentaram separação de fases (14) mostram-se em regiões que continham uma variação da fase oleosa de 30 a 80% e de 10 a 60% de tensoativo.

No estudo desenvolvido por Bonifácio et al. (2015) um sistema nanoestruturado foi desenvolvido com os componentes semelhantes aos que foram empregados neste sistema, com exceção apenas da quitosana. Os autores elucidaram a presença de formulações semelhantes as que foram encontradas neste trabalho entretanto, nota-se algumas diferenças no perfil das formulações. No presente estudo apenas uma formulação (F1) foi classificada como sendo um sistema líquido transparente, já no trabalho de Bonifácio foram encontradas 3 formulações com este perfil (F1, F9 e F16) o que pode inferir que o emprego da quitosana à fase aquosa deste sistema promoveu uma maior estruturação do mesmo, o que era esperado, uma vez que se trata de um polímero. Esta importante observação demonstra mais uma vez que a incorporação de polímeros a formulações nanoestruturadas exerce um papel crucial na característica física das mesmas.

Dentre as 36 formulações desenvolvidas, foram selecionadas duas para a realização dos experimentos de caracterização bem como os experimentos biológicos, sendo elas F1 e F9. O motivo da escolha da F1 deu-se por ter se apresentado como a mais líquida e transparente do diagrama de fases e a única formulação liquida transparente, sendo assim, a utilização da mesma na realização das análises biológicas *in vitro* mostra-se ideal. Já a formulação F9 mostrou-se diferente, sendo inclusive classificada em outra região do diagrama, todavia, tenha se mostrado viscosa, também apresentou estabilidade e

transparência. Esta viscosidade torna-se interessante para administração em mucosas e nas análises de inibição de biofilmes *in vitro*, pois garante uma maior adesividade no local de aplicação, sendo assim nos propomos a analisar também o comportamento desta formulação nas análises *in vitro* e principalmente no ensaio terapêutico *in vivo* de candidíase vulvovaginal.

Ao avaliar o perfil anisotrópico das formulações (Figura 35) foi possível compreender as diferenças existentes entre as mesmas de forma direta e geral. A F1 apresentou campo escuro por MLP, ou seja, não possui a capacidade de desviar o plano de luz emitido, sendo esta uma característica de formulações líquidas transparentes. Já F9 apresentou estruturas de estrias durante a observação, isto indica que esta formulação possui uma maior estruturação, o que é condizente com sua característica física mais viscosa. Por meio deste resultado pode-se confirmar que adição de que a medida que se aumentou a quantidade de tensoativo à formulação houve uma modificação do perfil anisotrópico da mesma. Adicionalmente, nota-se que após a incorporação do derivado vegetal ambas as formulações apresentaram mudanças nos seus perfis de anisotropia, estruturando-se ainda mais. Este mesmo fenômeno foi elucidade por Salamzi e colaboradores (2015) durante o desenvolvimento de um sistema líquido para incorporação de curcumina.

No ensaio de dispersão por luz dinâmica pode-se observar que todos as formulações, com ou sem a presença do derivado vegetal estão de acordo com relatos da literatura, os quais indicam que nanomicelas que compõem as nanoemulsões devem apresentar tamanhos que estejam entre 50 a 200 nm (THAKUR et al., 2012; MAHATO, 2017). Embora sejam pequenas, o aumento do tamanho das partículas após a incorporação nos sistemas remete à ideia de que o derivado vegetal foi incorporado as mesmas. Através do ensaio de estabilidade realizado pode-se constatar que não houve diferenças significativas entre os tempos de análise, uma vez que o padrão de tamanhao manteve-se constante, o que confere estabilidade às partículas que compõe estes sistemas. As imagens de TEM (Figura 39) confirmam estes resultados.

Adicionalmente, valores de polidispersão fornecem um parâmetro satisfatório das partículas ao evidenciar que existe certa homogeneidade entre as nanomicelas que compõe as formulações. No trabalho desenvolvido por Zorzi e colaboradores, o qual objetivou o desenvolvimento de uma nanoemulsão para a incorporação do extrato de *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. voltando-se à utilização do mesmo com como antioxidante também foram evidenciados a mesma correlação entre os de IPD e o tamanho das partículas (ZORZI

et al., 2016).

Nas análises que determinaram o potencial Zeta das formulações (Tabela 9) observa-se uma redução do valore do PZ a medida que a quantidade de tensoativo foi aumentado, o que era esperado, uma vez que este experimento as cargas elétricas entre a superfície da partícula e o meio específico, estando diretamente envolvido na estabilidade física das partículas, este pode ser influenciado por alterações que possam ocorrer na interface com o meio dispersante, ou seja, na dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou na adsorção de possíveis espécies iônicas presentes no meio aquoso (OBEIDAT et al., 2010).

Os fosfolipídios como a fosfatildilcolina utilizada neste estudo é um dos principais componentes presentes nas formulações capazes de influenciar o PZ, que inclusive pode fornecer um potencial negativo à interface devido grupamentos ésteres livre presentes na estrutura do lipídio (SILVA et al., 2016).

A quitosana, polissacarídeo catiônico, pode fornecer cargas positivas a partícula, Calvo et al. (1997) desenvolveram nanoemulsões contendo esse constituinte e observou potencial de superfície positivo às partículas (ζ = +37 mV). Analisando a tabela acima observa-se que o PZ para ambas as formulações selecionadas (F1 e F9) foram positivas ζ = 5,88 ± 0,271 mV e ζ 2,16 ± 0,186, mas, os valores obtidos não são tão altos, e sim mais próximos de zero, este fato pode estar relacionado com a baixa concentração de quitosana presente nas formulações.

Diante dos resultados obtidos observa-se ainda uma redução do valor de PZ ao aumentar a concentração de tensoativo na formulação, ou seja, ao aumentar a concentração de tensoativo há um aumento de carga negativa proveniente da fosfatidilcolina de soja, consequentemente há uma redução do valor do PZ de F1 para F9.

Na análise das propriedades mucoadesivas das formulações sobre a mucosa vaginal de suíno (Figura 36) foram obervadas grandes diferencas entre as duas formulações, o que já era esperado visto ao perfil mais viscoso de F9 em relação à F1. Estes dados confirmam que tratam-se de formulações com propriedades mucoadesivas, sendo essas ideias para a aplicação vaginal, em especial a F9. A vagina consiste em uma via de administração de fármacos de grande importância, uma vez que trata-se de um órgão rico vascularização, o que favorece a absorção dos princípios ativos evitando o efeito de primeira passagem pelo fígado, entretanto, para que esta interação seja satisfatória é necessário que exista um contato direto entre a mucosa e o sistema de liberação de fármaco, sendo assim, o uso de formulações adesivas mostra-se ideal para a administração por esta via (PALMEIRA-DE-OLIVEIRA;

PALMEIRA-DE-OLIVEIRA; MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, 2015).

Estas afirmações qualificam a formulação F9 como apta para ser administrada por via intravaginal. Todavia, formulações líquidas transparentes com propriedades adesivas inferiores também vem sendo empregadas para liberação em mucosa vaginal e resultados promissores vem sendo observados (SILVA et al., 2014). No estudo de Bonifácio et al. (2015) uma formulação líquida transparente foi empregada para a administração de *Astronium urundeuva* por via vaginal de ratos, a qual apresentou excelentes resultados relacionados com a atividade terapêutica da CVV.

Os ensaios reológicos de fluxo contínuo confirmam as diferenças existentes entre estes sistemas. Este tipo de experimento permite avaliar o comportamento de fluxo que o material em análise apresenta quando este sofre uma determinada tensão (SAVIC et al., 2011). O que define o comportamento de fluxo do material estudado é a correlação entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento, que é representada graficamente em diagramas denominados de curvas de fluxo, tais como apresentados na Figura 36. Essas curvas são reflexo de duas etapas do estudo, no qual o aumento da taxa de cisalhamento é revelado pela curva ascendente e a diminuição da taxa de cisalhamento é representada pela curva descendente (PESTANA et. al., 2009). A partir deste experimento, classifica-se pela observação da curva ascendente, o material em análise, como newtoniano ou não newtoniano. Posteriormente, caso seja não newtoniano, o material pode ser classificado ainda como pseudoplástico, plástico ou dilatante. Quanto à curva descendente, os materiais podem ser diferenciados em tixotrópicos de tempo dependente ou tixotrópico de tempo independente ou repéticos (CALIXTO et. al., 2013).

A formulação F1 apresentou características de fluídos newtonianos, ou seja, formulações liquidas que não sofrem interferência devido a mudança de fluxo contínuo. Como esperado, ao incorporar o derivado vegetal a esta formulação observou-se uma pequena diferença na característica do fluxo desta formulação, passando a apresentar um perfil pseudoplástico moderado. As análises visuais e por MLP podem confirmar a mudança deste perfil, uma vez que a incorporação promoveu uma maior consistência do sistema, bem como a mudança do perfil anisotrópico do mesmo.

Em relação ao reograma de fluxo continuo de F9 e F9I pode-se constatar que amas as formulações (não incorporada e incorporada) apresentaram característica de formulações pseudoplásticas. Este tipo de formulações mostram-se ideais para a administração de biotivos por via tópica com muita ou pouca vascularização uma vez que podem oferecer um aumento

da viscosidade após a aplicação e consequente aumentar a retenção dos princípios bioativos por via vaginal e aprimorar a eficácia terapêutica (RAVANI et al., 2013).

O uso de formulações pseudoplásticas é apreciado por pesquisadores que visam uma aplicação de princípios ativos em locais que possuem movimentação constante, tais como mucosa ocular, vaginal e intestinal. Em um estudo realizado por Kalam e colaboradores foi desenvolvido um sistema microemulsionado para veiculação de gatifloxacina por via ocular, no qual, os autores constataram que o uso de uma formulação com perfil pseudoplastico promoveu um contato mais intenso com o local de aplicacao, bem como favoreceu a liberação direta na área de contato pretendida (KALAM et al., 2016). Já no estudo de Salmazi et al. (2015) formulações pseudopásticas foram desenvolvolvidas com o intuito de promover a liberacao de curcumina por via intravaginal.

O comportamento reológico em fluxo oscilatório mostrou que ambas as formulações apresentaram comportamento predominantemente elástico. Formulações elásticas mostram-se interessantes para a administração de fármacos por via intravaginal, uma vez que podem conferir um maior padrão de adesividade na via administrada (SALMAZI et al., 2015). Visto estas características conferidas às formulações e a superioridade da elasticidade observada após a incorporação, conclui-se que estas formulações (em especial a F9 a qual apresentou perfil superior) estão aptas para serem veículos de bioativos por via intravaginal.

Visto as todas as propriedades satisfatórias atribuídas aos sistemas desenvolvidos, os ensaios biológicos foram iniciados empregando as formulações F1 e F9 como sistemas de veiculação para o extrato bruto e a fração Fr3.

Nos ensaios da atividade antimicrobiana contra células planctônicas de *C. albicans* (Tabela 11), *L. acidophilus* e *G. vaginallis* (Tabela 12) é possível verificar que as formulações exerceram um importante perfil inibitório após a incorporação dos derivados vegetais.

Nota-se que no extrato metanólico os valores de CIM do extrato não incorporado e incorporado foram: ATCC 10231 = de 500 µg/mL para 62,5 µg/mL, CAV3 = de 500 µg/mL para 125 µg/mL, CAS1 = de 1000 para 500 µg/mL; Urine 1= de 500 para 32,5 µg/mL e Urine 2 de 500 para 62,5 µg/mL, entretanto manteve-se inativo frente ao *L. acidophilus*, com exceção apenas quando foi incorporado na formulação F9.

Para a fração Fr3 observou-se que os valores relacionados com o padrão inibitório também foram aprimorados: ATCC 10231 = de 62,5 µg/mL para 31,2 µg/mL, CAV3 = de 125 µg/mL para 62,5 µg/mL, CAS1 = 62,5 µg/mL para 15,6 µg/mL, Urine 1= de 62,5 para 7,8 µg/mL, Urine 2= de 250 para 15,6 µg/mL quando incorporado em F1 e 3,9 µg/mL quando

incorporado em F9, todavia manteve a atividade para o *L. acidophillus* ATCC 4356 = 500 µg/mL.

Nos ensaios com a cepa de *G. vaginalis* percebe-se que o extrato metanólico de *s. nitens* mostrou-se inativo (>1000 µg/mL) todavia, após a incorporação em ambos os sistemas passou apresentar valores de CIM= 1000 µg/mL. Já a fração Fr3 foi mais ativa apresentando CIM= 500 µg/mL, o qual foi mantido quando a mesma foi incorporada nas formulações.

A mesma tendência que se refere ao aprimoramento do perfil de atividade antifúngica foi também observado nos ensaios com as cepas não-*albicans* (Tabela 13).

Estes resultados demonstram que os sistemas nanoestruturados possuem a capacidade de aprimorar a propriedade antimicrobiana dos derivados vegetais. A razão hipotética deste aumento pode estar relacionada com a interação direta entre as nanomicelas lipídicas que compõe os sistemas com as membranas celulares das leveduras e bactérias empregadas na investigação. De acordo com Lin et al. (2015) a presença de micelas compostas por lipídeos organizados e estruturados em ordem de nanômetros conferem uma maior interação com as membranas lipídicas no sítio de ação pretendido. Esta propriedade confere a estes tipos de sistemas uma característica biológica atraente para criar-se interações diretas e mais especificas com determinados tipos de células, tais como as microbianas. A literatura científica apresenta importantes estudos investigativos que empregaram nanoemulsões como sistemas de liberação de fármacos capazes de aprimorar a capacidade antimicrobiana de princípios ativos.

Fernandez-Campos et al. desenvolveram um sistema nanoemulsionado para a incorporação do fármaco nistatina e avaliaram sua eficácia frente à cepas de *Candida albicans* e *Saccharomyces cereviseae*. Foi observado que após a incorporação no sistema houve significativo aumento do perfil antifúngico, o qual sugere que a nanoemulsão aumenta a atividade antimicrobiana da nistatina. Segundo os autores isso pode ser explicado pela interação melhor de fármaco dentro das moléculas de nanoemulsão com as membrana das células fúngicas (FERNÁNDEZ-CAMPOS et al., 2013)

Alkhatib e colaboradores (2013) desenvolveram nanoemulsões que também continham colesterol e fosfatidilcolina de soja como constituintes e verificaram que os sistemas formados foram ativos contra *Staphylococcus aureus* e exerceram interferência na permeabilidade celular bacteriana (ALKATIB et al., 2013)

No trabalho desenvolvido por Ghosh e colaboradores uma nanoemulsão lipídica foi desenvolvida à base de óleo de gergelim para incorporação do eugenol. A atividade

antibacteriana da nanoemulsão com e sem a presença do constituinte ativo foi investigada juntamente com o modo de ação sobre cepas de *S. aureus*. Os autores descreveram que a nanoemulsão que continha eugenol incorporado exibiu atividade bactericida contra *S. aureus*. Ao analisarem a conformação da membrana bacteriana após o tratamento (microscopia eletrônica por fluorescência), os autores evidenciaram que a mesma comprometida após o tratamento com nanoemulsão que continham o eugenol, o qual alterou a permeabilidade da membrana com a consequente morte celular (GHOSH; MUKHERJEE; CHANDRASEKARAN, 2014).

Os dados obtidos nos ensaios de determiação do mecanismo de ação mostram resultados distintos. No ensaio com exógenos de ergosterol (Tabela 14) ao que tudo indica, as amostras (não incorporadas e incorporadas nas formulações nanoestruturadas) parece se ligar ao ergosterol da membrana do fungo, o que aumenta a permeabilidade iônica, levando à morte celular. Este mesmo modo de ação é observado para anfotericina B, usada como controle positivo neste experimento, o que é uma clássica ação de derivados de *S. nitens* como semelhante à dos polènicos empregados em prática clínica (FREIRES et al., 2014).

Nenhuma diferença nos valores de CIM foram observadas com o ensaio do sorbitol (Tabela 15), o que indica que os derivados vegetais não incorporados e incorporados não exercem ffunção na síntesa da membrana celular fúngica.

Sucessivamente à atividade antimicrobiana observada sobre células planctônicas, a investigação do potencial inibitório da Fr3 sobre biofilmes monotípicos de *C. albicans* também apresentaram satisfatórios perfis de inibição.

Ao observar os dados apresentados nas Figuras 40, 41 e 42 é possível verificar a superioridade de ação da Fr3 quando foi incorporada nas duas formulações (F1 Fr3 e F9 Fr3). Estas informações são de grande importância para a área cientifica que busca incansavelmente novas alternativas contra biofilmes. A atividade de sistemas nanoestruturados sobre biofilmes vem se classificando como uma estratégia que promete conferir aos fármacos disponíveis uma maior biodisponibilidade de ação biológica.

De acordo com Rizzello e colaboradores (2013) a aplicabilidade destes sistemas durante o tratamento de biofilmes é variável, no entanto, os sistemas de administração de fármacos baseados na nanotecnologia podem promover a interação direta com a estrutura complexa dos biofilmes e exercer ação nos diferentes estágios da formação do biofilme. Entre as principais habilidades desses sistemas, duas são predominantemente estudadas pelos pesquisadores, sendo elas: a interação direta com células planctônicas (células únicas) e a

interação ou desnaturação da matriz polimérica. A literatura vem mostrando nos últimos anos que as nanoemulsões podem ser uma excelente estratégia para o controle de biofilmes, sejam eles fúngicos, bacterianos ou mistos.

O estudo desenvolvido por Ribeiro e colaboradores (2013) avaliou o potencial fotodinâmico de cloreto de alumínio-ftalocianina (ClAlPc) incorporado em uma NE catiónica e aniônica a fim de investigar o potencial de inativação de células planctônicas e de biofilmes de *C. albicans* em comparação com o ClAlPc livre. Os resultados mostraram que u uso de uma NE catiônica promoveram a fotocombinação do composto ativo sobre células planctônicas e biofilmes e *C. albicans* ocasionando na inibição dos mesmos, sendo esta ação superior quando comparada com o uso do composto livre (RIBEIRO et al., 2013).

Sequencialmente a estes resultados os autores voltaram os estudos empregando a promissora nanoemulsão sobre células planctônicas e biofilmes de *S. aureus* resistentes e sensíveis à meticilina. Foi observado um significativo efeito inibitório após o tratamento de biofilmes maduros, evidenciando que a nanoemulsão contendo o ClAlPc reduziu o metabolismo celular em 80 e 73% das cepas suscetíveis e resistentes, respectivamente de acordo com um ensaio de viabilidade empregando a mesma metodologia deste trabalho (redução do XTT) (RIBEIRO et al., 2015).

A razão pelo qual foi observado uma superioridade de ação após a incorporação nos sistemas pode estar relacionada com a propriedade adesiva destas formulações sobre a superfície. Ao adicionar as formulações sobre os biofilmes maduros, observou-se que as mesmas permaneciam fixadas de maneira mais direta com a superfície sólida dos mesmos, e este contato mais intenso pode também ser o responsável pela ação superior. Outra hipótese se faz na presença de tensoativo na composição dos sistemas, uma vez que estes podem exercer ação adstringente sobre as proteínas que compõe a matriz polimérica dos biofilmes (SIMÕES et al., 2006).

A literatura apresenta resultados promissores referentes à atividade de derivados vegetais incorporados em sistemas nanoemulsionados contra biofilmes microbianos (SADEKUZZAMAN et al., 2015; GHARENAGHADEH et al., 2017). A junção da fitoterapia com a nanotecnologia farmacêutica fornece grandes oportunidades para o controle de doenças microbianas, em especial ao controle de biofilmes (RAMOS et al., 2018).

Os resultados que mostraram a atividade de Fr3 contra biofilmes estimularam o aprofundamento dos estudos do potencial anti-biofilme dos derivados de *S. nitens.* Uma avaliação da capacidade de interferência na adesão de *C. albicans* sobre a superfície foi

realizada, a fim de entender qual seria o comportamento deste micro-organismo ao aderir em superfícies que continham as amostras analisadas. Para tal, uma determinação da cinética de adesão de *C. albicans* em câmara de fluxo sob condições hidrostáticas foi realizada afim de verificar este comportamento.

Esta metodologia classifica-se em uma importante ferramenta para avaliar a adesão de micro-organismos em superfícies que contenham agentes antimicrobianos. Através de uma monitoração em tempo real, verifica-se este comportamento de forma precisa e com isso estima-se a habilidade que estes micro-organismos terão em formar biofilmes. O emprego deste método é consagrado pela área científica uma vez que é possível criar condições similares as que ocorrem no organismo, bem como destinar quantidades suficientes e padronizadas de nutrientes e compostos especiais às células aderidas em superfícies as quais irão iniciar o processo de formação de biofilmes (BUSSCHER; MEI, 2006). Adicionalmente, trata-se de um procedimento que permite a possibilidade de resultados com melhor reprodutibilidade, refletindo diretamente na fidedignidade dos resultados obtidos (HEYDORN et al., 2000).

Para iniciar os experimentos, e criar uma superfície suscetível à fixação das amostras à superfície do vidro que compôs a câmara de fluxo, o procedimento de limpeza e preparação desta superfície foi essencial para o sucesso da metodologia. O vidro é considerado o melhor material para constituir câmaras de placas paralelas em ensaio de inibição da adesão de micro-organismos em condições de fluxo (BUSSCHER; MEI, 2006; HYUN; SALEHI; FERRACANE, 2015), e, placas de vidro preparadas desta forma torna-se completamente molháveis por água (ângulo de contato= 0) e suscetíveis a promoção de monocamadas de substancias antimicrobianas (SONG et al., 2016).

Um experimento semelhante ao que foi realizado neste estudo avaliou a capacidade de biosurfactantes produzidos por *Lactobacilus* sp. em interferir na adesão de *Enterococcus faecalis* uropatogênico. No qual qualificou esta técnica como sendo uma importante ferramenta na para avaliar a capacidade de compostos bioativos em inibir a adesão de micro-organismos patogênicos (VELRAEDS; MEI; BUSSCHER, 1996)

Neste experimento foi verificado que as amostras vegetais não incorporadas nos sistemas de liberação de fármacos promoveram o declínio da adesão de *C. albicans* sobre a superfície. Nos experimentos onde foram utilizados estes compostos incorporados nas duas formulações (F1 e F9) não foram evidenciadas diferenças, o que supostamente pode ser explicado pela liberação dos componentes ativos dentro da câmara de fluxo.

Estes resultados (Figura 43 e 44) indicam que os compostos possuem a propriedade de interferir neste fenômeno e consequentemente atuar como um agente inibidor de adesão, o que reflete diretamente na formação de biofilmes. Embora não houve uma inibição total da adesão, estes dados qualificam-se de maneira satisfatória, uma vez que menores quantidades de células aderidas à superfície tem uma relação direta com a formação e espessura dos biofilmes que serão originados, facilitando assim a terapia.

Os dados apresentados na Figura 45 comprovam que estes compostos foram capazes de interferir na adesão de *C. albicans*, uma vez que é possível observar diferenças importantes entre o vidro limpo (sem a presença das amostras) e os que continham as amostras. Após a passagem de uma interface líquido-ar no interior da câmara de fluxo que continham as células aderidas ao final de duas horas do período de adesão, pode-se notar que o número de células leveduriformes que continuavam aderidas foi exponencialmente menor. A utilização desta interface permitiu remover as leveduras que estavam fracamente aderidas e quantificar o numero de células que estavam fortemente aderidas à superfície e que, consequentemente, estariam aptas para iniciar o processo de formação do biofilme.

Ao analisar a características físicas e químicas das superfícies de vidro que continham as amostras pode-se confirmar que existem mudanças em sua composição, provando que a as amostras foram adsorvidas à superfície empregada como suporte para a realização do ensaio de adesão. Com base na Tabela 17, é possível constatar que existem mudanças significativas na composição elementar das superfícies quando comparado com a superfície limpa.

O vidro é um material rico em sílica. Ao analisar a amostra limpa confirmou-se a presença desta substancia na composição elementar pela análise do XPS (22,9%), entretanto, comparar-se as amostras que continham os compostos adsorvidos sobre as superfícies do vidro nota-se total ausência deste composto (0,0%). Estes resultados confirmam que existiam monocamadas sobre estas amostras, o que classifica o processo de adsorção realizado como sendo válido e aplicável. Estes dados mostram que as criações destas monocamadas foram satisfatórias. Estas informações podem ser claramente observadas nos espectros que foram apresentados na Figura 47.

A análise do ângulo de contato da água (Tabela 16) sobre as monocamadas mostrou que se tratavam de superfícies com características hidrofílicas. A literatura apresenta importantes resultados sobre atividade antimicrobiana de superfícies hidrofílicas contra micro-organismos patogênicos. O estudo pioneiro realizado por Daeschel e colaboradores avaliou a capacidade da nisina, um conservante natural muito utilizado em alimentos em, após

adsorção sobre superfícies hidrofílicas. Os resultados deste estudo mostraram que este tipo de superfície agiu de forma favorável para a adsorção do composto estudado, o qual foi promissor na inibição de *Pediococcus pentosaceus* (DAESCHEL; MCGUIRE; AL-MAKHLAFI, 1992). Já no estudo realizado por Stevens et al., foram criadas superfícies hidrofílicas contendo nanopartículas de prata para revestir a superfície de cateteres urinários a fim de impedir a adesão de *S. aureus.* Notavelmente, foi evidenciado uma excelente diminuição da adesão deste micro-organismo sobre a superfície, o que indicou que esta superfície foi capaz de interferir na adesão deste patógeno (STEVENS et al., 2011).

Durante uma investigação empregando componentes hidrofílicos para revestir a superfície de próteses dentárias totais, Yoshijima e colaboradores verificaram que a criação deste tipo de superfícies foi promissora no impedimento da adesão de *C. albicans* em morfologia leveduriformes, bem como no estágio filamentoso (hifas). Os autores afirmam que o revestimento hidrofílico da superfície da dentadura pode ser um método potente para a redução da aderência de células fúngicas, especialmente quando se trata de hifas, as quais são responsáveis por quadros clínicos severos de estomatite dentária e infecções relacionadas (YOSHIJIMA et al., 2010).

Expandindo os estudos com biofilmes relacionados com a CVV, foram criados biofilmes compostos por *C. albicans* + *L. acidophilus* e *C. albicans* + *G. vaginallis*, uma vez que estes micro-organismos estão diretamente relacionados com o estabelecimento da CVV. *L. acidophilus* é uma bactéria que assim, como *C. albicans* habita comensalmente o ambiente vaginal, sendo a responsável pela produção de ácido lático que previne o estabelecimento da infecção pela levedura. Entretanto, em casos de imunossupressão e/ou desequilíbrio da proliferação microbiana, dentre outros fatores, este micro-organismo é inibido, favorecendo a proliferação de *C. albicans* e consequentemente o desenvolvimento da CVV (GONÇALVES et al., 2016). Já em quadros mais severos da doença (CVVR), estudos mostram que existe uma correlação direta da presença de *C. albicans* e *G. vaginallis* atuando ativamente no progresso do estado infeccioso (MATHESON; MAZZA, 2017).

Por meio dos ensaios que determinaram a biomassa total (Figura 48) através do método de coloração do cristal violeta, foi possível verificar que os biofilmes foram criados com sucesso apresentando biomassa suficiente para que os ensaios de inibição fossem realizados. Este tipo de metodologia é muito empregado em pesquisas relacionadas com a formação de biofilmes, no qual é possível quantificar a biomassa total dos mesmos após o processo de formação. Uma desvantagem do mesmo é a impossibilidade de diferenciação

entre viabilidade ou morte celular, uma vez que se trata de um método que cora ambos os tipos de células que compõe os biofilmes, neste sentido, é um método quantitativo que fornece a confirmação de que a "massa microbiana" foi criada (MARCOS-ZAMBRANO et al., 2014).

Ao observar a absorbância do cristal violeta, nota-se que os biofilmes formados por *C. albicans* (monotípicos) apresentaram valores de DO maiores em relação aos outros biofilmes, isso pode ser explicado devido às interações presentes entre bactérias e leveduras quando compõe um biofilme multi-espécies. É conhecido o fato de que bactérias e leveduras podem viver em relação simbiótica em formar comunidades (biofilmes), nas quais existe um complexo mecanismo de comunicação (*quórum sensing*) onde toxinas são excretadas pelos integrantes destas comunidades, ora como uma estratégia de sobrevivência ou pela necessidade de sinalização química (HARRIOTT; NOVERR, 2011). Adicionalmente, ao observar os dados da Tabela 18, verifica-se a espessura destes biofilmes através da análise por TCO, confirmando mais uma vez o processo de formação.

Ao avaliar a atividade dos derivados vegetais não incorporados e incorporados nas formulações observa-se resultados significativos de inibição. Nos biofilmes compostos por *C. albicans* + *G. vaginallis* (Figura 49. A) nota-se que houve significativo declínio da atividade metabólica destes biofilmes após os tratamentos, o que indica que os mesmos foram ativos e com uma atividade acentuada após a incorporação nos sistemas nanoestruturados. Ao avaliar o número de UFC (Figura 49. B→E) remanescentes após os tratamentos, observa-se que estes foram ativos de forma igualitária em ambos os micro-organismos em todas as concentrações empregadas nas análises.

Nos biofilmes formados por *C. albicans* + *L. acidophilus* (Figura 50) percebe-se que os tratamentos também foram ativos, entretanto foram menos ativos quando comparados com os resultados encontrados apresentados na Figura 49 (ensaios com biofilmes formados com *C. albicans* + *G. vaginallis*). Nos resultados obtidos com a quantificação do número de UFC é possível verificar que os tratamentos empregando as concentrações de 20X a CIM (Figura 50.B) e 10X a CIM (Figura 50.C) foram mais ativos contra *C. albicans* do que ao *L. acidophilus*, já as concentrações de 5 e 1X a CIM (Figura 50.D e 50.E) exerceram ação inibitória similar entre ambos micro-organismos. Estes resultados são de extrema importância para a área medica, uma vez que dão um indicio de uma ação de certo modo mais seletivo para a levedura em comparação ao *L. acidophilus*, dando a oportunidade de um reestabelecimento da microbiota vaginal de forma mais satisfatória.

O motivo pelo qual os tratamentos foram menos ativos nestes biofilmes podem ser justificados ao observar os resultados apresentados na Figura 51, onde mostram os resultados da atividade das amostras analisadas frente a biofilmes monotípicos de *L. acidophilus*, onde se observa que os tratamentos foram menos ativos para estes biofilmes. Já no caso dos biofilmes monotípicos de *G. vaginallis* nota-se uma superioridade de ação, principalmente nas concentrações de 20, 10 e 5X a CIM.

Observa-se que os tratamentos exerceram excelente capacidade inibitória sobre biofilmes monotípicos de *C. albicans*, a qual se mostra superior quando comparado com os outros tipos de biofilmes formados. A atividade anti-biofilme de *C. albicans* foi observada nos estudos anteriores, onde o extrato metanólico de *S. nitens* foi capaz de inibir biofilmes maduros desta espécie (RAMOS et al., 2016), entretanto, no caso dos biofilmes heterotípicos, pode-se afirmar que a inferioridade de ação é oriunda da presença das cepas bacterianas.

Como observado em todos os experimentos realizados, as amostras vegetais exerceram capacidade inibitória frente a todos os biofilmes formados sobre a superfície das placas de 24 poços, e superiormente, quando as mesmas foram incorporadas nas duas formulações empregadas, observou-se que uma menor quantidade de amostra foi necessária para promover a ação inibitória. Estes resultados demonstram mais uma vez que sistemas de liberação de fármacos baseados em nanotecnologia possuem a capacidade de aprimorar a atividade antimicrobiana de princípios bioativos (BLECHER; NASIR; FRIEDMAN, 2011b). Uma série de estudos demonstram a capacidade de diversos tipos destes sistemas em viabilizar a terapêutica sobre biofilmes, inclusive nanoemulsões lipídicas (RAMOS et al., 2018).

Voltando-se em aprimorar os conhecimentos sobre a capacidade terapêutica dos derivados de *S. nitens* incorporados ou não em sistemas nanoestruturados, desenvolvemos neste estudo uma análise à nível molecular para verificar a influência dos tratamentos sobe a expressão de genes específicos relacionados com a adesão (ALS3), resistência à múltiplos fármacos (CDR1 e CDR2) e a biossíntese do ergosterol (ERG 11). Para tal, os mesmos biofilmes foram formados e tratados com a concentração de 1X o valor da CIM sobre células planctônicas de *C. albicans*. A escolha desta concentração baseou-se na capacidade de promover interação tanto como em células planctônicas de *C. albicans*, bem como com os biofilmes, entretanto, não promove a inibição total dos mesmos, o que se torna ideal para a extração de proteínas necessárias para a realização do ensaio de PCR em tempo real.

Diversos grupos de genes estão relacionados com a formação de biofilme em *Candida*

spp. Dentre estes são destacados os genes da família ALS (Agglutinine Like Sequence – oito genes: ALS1-ALS7 e ALS9) presentes em *C. albicans, C. glabrata* e *C. tropicalis*. Codificam proteínas relacionadas com a adesão à superfície da célula hospedeira (SARDI et al., 2013) e são regulados e expressos em função dos processos fisiológicos celulares, tais como o estágio de crescimento e morfologia da célula, ou seja, na fase leveduriforme ou na forma de hifas e pseudo-hifas (MURCIANO et al., 2012).

O fenômeno de adesão classifica-se como uma das principais características atribuídas a *C. albicans* no evento de infeção, no qual, mecanismos relacionados com produção de adesinas e produção de hifas são os responsáveis pela progressão da doença. A presença de hifas é um dos fatores primordiais para a disseminação em tecidos, principalmente em mucosas. Dos genes pertencentes ao grupamento ALS, o ALS3 é associado com a produção de hifas em *C. albicans* (LIU e FILLER et al., 2011). Nailis et al. (2006) compararam a expressão gênica de ALS1 e ALS3 entre as células do biofilme de *C. albicans* formadas sobre a superfície de silicone e células em estágio planctônico, e mostraram a superioridade da expressão de ALS3 sobre em biofilmes de *C. albicans*, a qual foi explicada pela presença desta estrutura na arquitetura tridimensional séssil.

Neste estudo, verificamos que os tratamentos empregando os derivados vegetais não promoveram a diminuição da expressão deste gene (Figura 54), em alguns casos, nota-se a supre expressão dos mesmos. O motivo pelo qual este fenômeno ocorreu pode estar relacionado com o fato de que os biofilmes já estavam formados sobre a superfície e, consequentemente, já haviam expressado ALS3 para a promoção das hifas que compuseram os biofilmes. Por outro lado, além de participar ativamente nos processos de estruturação e fixação do biofilme, o evento de formação de hifas esta diretamente relacionado com características de virulência, sobrevivência e adaptação de *C. albicans* (MAYER; WILSON; HUBE, 2013), sendo assim, a interação dos biofilmes com os derivados vegetais incorporados e não incorporados pode ter ocasionado uma condição desfavorável para a manutenção do mesmo, neste sentido, a super expressão de ALS3 pode ter ocorrido como uma estratégia de defesa de *C. albicans* em razão do potencial inibitório exercido pelas amostras.

Vários mecanismos moleculares de resistência aos antifúngicos em espécies de *Candida* foram descritos, destacando-se, em particular: o aumento do efluxo de antifúngicos devido à super expressão de genes de efluxo, CDR1, CDR2 (da família de proteínas transportadoras de membrana ABC – ATP Binding Cassete) (TSAO et al., 2009), além disso, substituições de aminoácidos na enzima Erg11p, codificada pelo gene ERG11 foram

descritas, que por sua vez, pode estar super expresso nas células e alterações diversas da via biossintética do ergosterol, devido a alterações no gene ERG3 (MORSCHHÄUSER, 2010). Em vista destes fatores, os resultados das análises que quantificaram a expressão dos genes CDR1 e CDR 2 mostraram diferenças na expressão destes genes. Ao verificar os resultados apresentados na Figura 55 nota-se que todos os tratamentos promoveram a diminuição da expressão de CDR1 em relação ao controle (biofilmes não tratados), o que denota que os as amostras vegetais exerceram influência sobre este gene. Embora algumas amostras promoveram o aumento da expressão de CDR2 (Figura 56), ainda assim é possível observar a predominância do declínio de expressão deste gene. Estes dados sugerem que os derivados vegetais não induzem a resistência aos antifúngicos uma vez que diminuem expressão de genes de efluxo.

Em relação ao dados quantitativos da expressão de ERG 11 (Figura 57), verifica-se que, no geral, os tratamentos promoveram o aumento da expressão de ERG11 nos biofilmes de *C. albicans* e *C. albicans + G. vaginalis*, entretanto, nota-se o declínio dos níveis de expressão nos biofilmes compostos por *C. albicans + L. acidophilus* após o tratamento com todas as amostras empregadas na investigação. Estes dados são de extrema importância devido aos mecanismos de resistência e adaptação que ocorrem entre as espécies no decorrer do estabelecimento da CVV, bem como discutido e apresentado previamente neste documento.

Ao analisar os resultados apresentados na Tabela 19, os quais se referem ao perfil citotóxico das amostras vegetais não incorporadas e incorporadas nas formulações, observa-se que diferentes perfis de citotoxicidade foram encontrados.

De acordo com os resultados nota-se que o extrato de *S. nitens* não presentou toxicidade frente à todas as linhagens celulares empregadas na investigação, entretanto, observou-se que a Fr3 apresentou padrões inibitórios distintos entre as linhagens e com valores de IC_{50} inferiores, o que indica padrão de citotoxicidade maior. A diferença entre estes resultados é justificada uma vez que Fr3 é dotada do flavonoide luteolina, o qual é classificado como tóxico frente a algumas linhagens, em especial às tumorais, e visto a este potencial, a luteolina vem sendo emprega em investigações relacionadas com a terapia anticâncer (TJIOE, OLIVEIRA e GAVRD, 2016). Sendo classificada como uma aglicona flavonoídica, a luteolina apresenta um baixo grau de solubilidade em água, assim, pode permanecer por um curto período sendo não tão bem absorvida, o que dificulta casos de toxicidade aguda frente ao consumo desta substância (SIMÕES et al., 2017) tornando-a apta

para o uso na indústria farmacêutica.

Foi evidenciado que a incorporação nos sistemas de liberação de fármacos promoveu a diminuição dos valores de IC_{50} o que indica que esta à toxicidade é conferida aos mesmos. A incorporação dos derivados vegetais na formulação F9 mostrou-se mais tóxica em relação à F1. Tal perfil de toxicidade pode ser justificado ao aumento da quantidade de tensoativo neste sistema, uma vez que por estar em maior quantidade pode ter desnaturado a membrana lipídica celular das células utilizadas no estudo.

Os resultados aqui reportados mostram-se de grande significância, principalmente quando se compara com os dados de citotoxicidade exercido pela anfotericina B (IC_{50}= 4 e 5 μg/mL), fármaco considerado como "padrão ouro" para o tratamento de infecções fúngicas causadas por espécies de *Candida* que possuem resistência aos fármacos derivados de azóis.

Na pesquisa de novos fármacos é importante levar-se em consideração a via em que se pretende administrar o princípio ativo estudo para que padrões de toxicidade sejam ajustados. O fato de que fármacos administrados por via tópica possuem menores efeitos tóxicos quando comparados a outras vias como oral e parenteral já é conhecido, sendo assim, a proposta de emprego destas formulações para via tópica intravaginal é totalmente válida.

A fim de complementar os dados referentes ao perfil de toxicidade apresentados pelas amostras frente às linhagens celulares, empregou-se um modelo alternativo *in vivo* de toxicidade em *Artemia salina.* Este microcrustáceo marinho vem sendo muito usado como organismo alvo para *screening* de compostos bioativos e toxicologia. Isto se deve ao fato de além de ser um teste de fácil execução, não necessitar de condições estéreis para realização. Além disso, ensaios de letalidade utilizando a *A. salina* já tem sido extensamente utilizados na pesquisa e toxicologia aplicada (NUNES et al., 2006; ARCANJO et al., 2012; RAJABI et al., 2015).

Os resultados apresentados na Figura 58 (A) mostram que bem como nos ensaios *in vitro* com as linhagens celulares, a utilização do extrato de *S. nitens* não exerceram perfil tóxico sobre *A. salina* em todas as concentrações avaliadas,. Após a incorporação nos formulações foi verificado um pequeno declínio na viabilidade dos organismos, a qual foi mais intensa utilizando a amostras F9 EXT, o que confirma a idéia de que a formulação F9 apresenta perfil de toxidade superior em comparação com a formulação F1. Apesar deste perfil ter sido observado, em nenhum dos casos foram observados perfis de toxicidade superior a 50%.

Já no caso dos ensaios com a fração Fr3 (Figura 59), nota-se que ao utilizar esta

amostra livre, ou seja, sem ter sido incorporada nos sistemas (Figura 59.A) foi verificado um perfil de toxicidade (decrescente) nas concentrações de 500 a 125 μg/mL, entretanto manteve-se inerte nas outras concentrações. Ao incorporar a Fr3 nos sistemas de liberação de fármacos observa-se o declínio deste perfil, indicando que os sistemas tornaram a amostra menos tóxica (Figura 59 B e C).

De maneira geral, o ensaio com *A. salina* forneceu informações importantes para concluir os experimentos que visaram aprimorar o entendimento do caráter tóxico das amostras vegetais incorporadas e não incorporadas nos sistemas de liberação de fármacos. Embora algumas concentrações apresentaram toxicidade relativa, as mesmas são consideradas pequenas do ponto de vista clinico e científico.

No modelo experimental *in vivo* de CVV, observou-se de maneira mais precisa a aplicabilidade terapêutica da fração Fr3.

Com a finalidade de promover uma plataforma segura de testes avaliativos de drogas potencialmente promissoras em casos de infecções fúngicas, os modelos experimentais *in vivo* vem sendo empregados. Diversos modelos clinicamente relevantes vem sendo desenvolvidos com a finalidade de avaliar interações patógeno-hospedeiro, eficácia e farmacocinética de fármacos antifúngicos, e vacinas para candidíases sistêmicas e de mucosa. Os modelos experimentais *in vivo* de CVV têm sido úteis na identificação de fatores sobre a influência hormonal na infecção, a virulência das leveduras, a susceptibilidade e o tratamento da infecção (REPENTIGNY, 2004).

A capacidade de exercer controle sobre as variáveis experimentais que incluem a cepa do fungo, espécie hospedeira, concentração do inóculo, via de administração, e administração da farmacoterapia, representam grandes vantagens da experimentação animal, especialmente quando combinada com modelos validados estatisticamente onde o estado clínico da patologia mimetiza os mesmos sinais e sintomas observados em humanos. Os animais de laboratório mais utilizados são os ratos consanguíneos, embora os modelos de infecção por fungos fossem desenvolvidos em primatas, coelhos, cobaias, ratos, hamsters, pássaros, peixe-zebra, e caninos. A ampla disponibilidade de reagentes imunológicos definidos e linhagens murinas, e o baixo custo e espaço relativo associado com a manutenção de colônias em comparação com espécies hospedeiras maiores, tem impulsionado o uso do rato de laboratório frente à modelos de infecção por fungos (HOHL, 2014).

Ensaios experimentais de CVV *in vivo* permitem avaliar o desempenho de novos antifúngicos de uma forma mais precisa e confiável, uma vez que se trabalha com um

organismo vivo. Todavia, algumas considerações a respeito das características dos animais utilizados no desenvolvimento de protocolos de infecção devem ser levadas em conta, como a viabilidade do animal ao estado infeccioso, defesa imunológica e principalmente as características relacionadas com o ciclo hormonal do animal. Neste experimento foi empregado ratas fêmeas da linhagem *Wistar* para serem as receptoras da carga microbiana necessária para o desenvolvimento da infecção, entretanto, diferentemente dos seres humanos, *C. albicans* não é habitante comensal de mucosa vaginal de roedores (CASSONE; SOBEL, 2016). Neste sentido, foi necessário criar condições adequadas para que o estado infeccioso fosse estabelecido.

A imunossupressão de animais é muito importante no desencadeamento de diversos tipos de infecções, em especial, as infecções fúngicas que em sua maioria possuem caráter oportunista e necessitam que o sistema imunológico do hospedeiro esteja comprometido para seu desenvolvimento e proliferação (HUYAN et al., 2011). Neste estudo, empregou-se o agente quimioterápico ciclofosfamida (CP) o qual vem sendo muito empregado como agente imunossupressor no desenvolvimento de protocolos experimentais de infecções fúngicas (SVEKO et al., 2013. RAMOS et al., 2015, RAMOS et al., 2016). Influencia as células de tecidos normais, incluindo células do sistema imunológico, células de medula óssea (em especial o desenvolvimento de células sanguíneas), promovem a ativação de linfócitos (que se proliferam e produzem anticorpos), células fetais, células foliculares do cabelo e as células epiteliais do intestino delgado. CP enfraquece tanto a resposta imune celular e humoral. Seu efeito é dose-dependente, mas até mesmo uma única administração pode prejudicar temporariamente o sistema imunológico (WÓJCIK, 2014).

Em vista dos excelentes resultados relacionados com a imunossupressão dos animais que compuseram o ensaio experimental desenvolvido durante o projeto de mestrado do autor desta Tese, foi mantido este fármaco como agente imunossupressor, o qual novamente exerceu papel importante para o desenvolvimento do estado infeccioso. Ao observar os valores apresentados na Tabela 20 nota-se a diminuição do peso corpóreo dos animais que receberam o agente imunossupressor, bem como os inóculos microbianos, o que era esperado, uma vez que ao estarem em estado imunossupressivo, os animais tendem a comer menos e consequentemente leva-se a uma diminuição da massa corpórea.

Ao utilizar o estradiol como agente estrogênico, foi possível induzir a formação de um epitélio escamoso no ambiente vaginal, o que tonou o mesmo favorável para o desenvolvimento da infecção. Além deste parâmetro, a indução hormonal do ciclo estral

pretendido com este tipo de estrogênio possui a capacidade de inibir a resposta imune do hospedeiro aumentando o conteúdo de glicogênio, os substratos de pH e de crescimento que facilitam a adesão de *Candida* no tecido epitelial. Adicionalmente, o estrogênio pode afetar diretamente as células fúngicas, aumentando o número de células leveduriformes que possuam formação de tubos germinais, as quais estão relacionadas diretamente com o seu aumento e proliferação (MOSCI et al., 2013).

Considerando as condições experimentais desenvolvidas para o estabelecimento estado infeccioso os animais foram infectados com um inóculo misto composto por *C. albicans* e *L. acidophilus*. A intenção de utilizar ambos micro-organismos em conjunto baseou-se na relação simbiótica no ambiente vaginal humano e consequentemente no processo de desencadeamento da CVV. Os fatores recorrentes desta relação é a peca chave para que estado infeccioso seja iniciado e a colonização de *Candida* spp. seja exponencialmente elevada. O papel de *Lactobacilus* spp. em manter a homeostase vaginal, no qual refere-se principalmente em manter a população de *Candida* spp. controlada é bem conhecido. Neste evento, diversos fatores estão relacionados com o déficit populacional e/ou promoção da ineficiência de *Lactobacilus* spp. entretanto, sabe-se que o desencadeamento de estados imunossupressores estão, aumento dos níveis de estrogênio e mudanças no pH vaginal possuem relação direta com esse fenômeno, o qual condiciona a um índice exacerbado da propagação de *Candida* spp. no ambiente vaginal das hospedeiras.

Ao analisar os dados apresentados na Tabela 21 é possível constatar este fenômeno ao observar os resultados referentes ao grupo controle de infecção 3 (infectados apenas com *L. acidophilus* → Grupo 3), onde foi verificado que a carga deste micro-organismo no ambiente vaginal dos animais (UFC/mL) mostrou-se fraca e indetectável logo ao quarto dia de análise. Este resultado é condizente, uma vez que os animais encontravam-se em estágio de imunossupressão, bem como com níveis elevados de estrogênio, o que impossibilitou o desenvolvimento deste micro-organismo de forma gradual.

Neste trabalho foi avaliada especificamente a atividade terapêutica da fração Fr3 oriunda do extrato metanólico de escapos de *S. nitens*, incorporado e não incorporado na formulação F9. A escolha desta formulação baseou-se nos excelentes resultados encontrados nos ensaios biológicos, bem como no perfil adesivo em mucosa quando comparada à F1. A adesividade sobre as mucosas vaginais é um fator de extrema importância para a liberação de fármacos por esta via, uma vez que garante contato direto dos bioativos com o sitio local de aplicação, garantindo uma liberação constante e pontual (SILVA et al., 2014).

Os dados relacionados a carga fúngica vaginal dos animais tratados com a Fr3 não incorporada (Grupo 7) e incorporada na NE (Grupo 9) observa-se que ambos desempenharam perfil terapêutico em todos animais que foram submetidos aos tratamentos. Em relação ao grupo 7, foi constatado a cura dos animais no 10 dia de análise, onde todos apresentaram carga fúngica vaginal negativa.

Já no grupo 9, concluiu-se um importante perfil de cura e superioridade de ação comparado com o tratamento realizado com a Fr3 não incorporada, uma vez que todos os animais submetidos ao tratamento com F9 Fr3 apresentaram decréscimo gradual da carga fúngica e foram considerados curados logo no sexto dia de análise da eficácia do tratamento. Os motivos desta importante ação podem ser explicados segundo os mesmos parâmetros que foram discutidos nos ensaios de determinação antifúngica *in vitro*, uma vez que a formulação empregada exerceu papel fundamental no desempenho da eficácia do tratamento, todavia, é justificável atribuir o padrão mucoadesivo como um forte coadjuvante da atividade observada, uma vez que promoveu um contato íntimo com o local infectado liberando o derivado vegetal de uma forma mais precisa e direta. Fazendo-se uma relação entres os resultados do tratamento com Fr3 não incorporada e incorporado é possível afirmar esta ideia, uma vez que no ato da administração por via intravaginal os animais ejaculavam automaticamente material depositado, fazendo com que uma quantidade mínima permanecesse no ambiente para desempenhar a ação terapêutica.

O aperfeiçoamento do potencial antifúngico de Fr3 após a incorporação no sistema de liberação de fármacos pode também ser confirmado quando se analisa os dados apresentados pelos tratamentos realizados com a formulação sem a presença do mesmo, uma vez que não exerceu perfil de cura nos animais infectados, observando-se que o curso da infecção foi mantido íntegro até o final do experimento.

É importante levar em consideração os resultados obtidos com o creme vaginal de anfotericina B, uma vez que foi observada a cura dos animais apenas no oitavo dia de análise, o que o mostra fraco perante os resultados com o extrato incorporado e não incorporado. Estes dados são de extrema relevância, uma vez que o extrato vegetal pode ser um possível candidato à substituição do fármaco na terapêutica deste tipo de infecção.

7. CONCLUSÕES

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

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

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

9. REFERÊNCIAS

ABAT, C.; CHAUDET, H.; ROLAIN, J. M.; COLSON, P.; RAOULT, D. Traditional and syndromic surveillance of infectious diseases and pathogens. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 48, n. July 1976, p. 22–28, 2016.

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

ACKER, H. VAN; DIJCK, P. VAN; COENYE, T. Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 6, p. 326–333, 2014.

ADAM, B.; BAILLIE, G. S.; DOUGLAS, L. J. Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis* **J. Med. Microbiol**, v. 51, n. MAY, p. 344–349, 2002.

ADOLFSSON, A.; HAGANDER, A.; MAHJOUBIPOUR, F.; LARSSON, P.-G. How Vaginal Infections Impact Women's Everyday Life
—Women's Lived Experiences of Bacterial Vaginosis and Recurrent Vulvovaginal Candidiasis. **Advances in Sexual Medicine**, v. 7, n. 1, p. 1–19, 2017.

ADWAN, G.; SALAMEH, Y.; ADWAN, K. Susceptibility of *Candida albicans* isolates to Terbinafine and Ketoconazole. **IUG Journal of Natural and Engineering Studies**, v. 20, n. 2, p. 45–53, 2012.

ALANAZI, F. K.; HAQ, N.; RADWAN, A. A.; ALSARRA, I. A.; SHAKEEL, F. Potential of lipid nanoemulsion for drug delivery of cholesteryl-hexahydrophthaloyl-5-fluorouracil. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 24, n. 5, p. 459–463, 2014.

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

ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 9, p. 4168–4170, 2001.

ALKATIB , M. H.; ALY, M. M.; BAGADAS, S. Antibacterial activity and mechanisms of action of lipi nanoemulsions against *Staphylococcus aureus.* **Journal of Pure and Applied Microbiology,** v.20, n. 2, p. 45-53, 2012.

ALMEIDA, M. A. N.; FRANÇA, F. P. DE. Biofilm formation on brass coupons exposed to a cooling system of an oil refinery. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 39–44, 1998.

ANDRADE-EIROA, A.; CANLE, M.; LEROY-CANCELLIERI, V.; CERDÀ, V. Solid-

phase extraction of organic compounds: A critical review. part ii. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 80, p. 655–667, 2016.

ANDRADE, M. J. G.; GIULIETTI, A. M.; RAPINI, A.; QUEIROZ, L. P.; CONCEIÇÃO, A. S.; ALMEIDA, P. R. M.; BERG, C. VAN DEN. Evidence from nuclear (ITS) and plastid (psbA-trnH and trnL-F) DNA sequences. **Taxon**, v. 59, n. 2, p. 379–388, 2010.

ANDREA, C.; CARDOSO, L.; ZANUTTO, F. V.; VARANDA, E. A.; SANO, P. T.; VILEGAS, W.; CAMPANER, L. Quantification of Flavonoids , Naphthopyranones and Xanthones in Eriocaulaceae Species by LC-PDA. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 3, n. February, p. 138–146, 2012.

ANTAS, P. R. Z.; BRITO, M. M. S.; PEIXOTO, É.; PONTE, C. G. G.; BORBA, C. M. Neglected and emerging fungal infections: review of hyalohyphomycosis by *Paecilomyces lilacinus* focusing in disease burden, in vitro antifungal susceptibility and management. **Microbes and Infection**, v. 14, n. 1, p. 1–8, 2012.

APARNA, M. S.; YADAV, S. Biofilms: microbes and disease. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 6, p. 526–530, 2008.

ARAMAKI, Y.; TOMIZAWA H, HARA T, YACHI K, KIKUCHI H, TSUCHIYA S. Stability of liposomes *in vitro* and their uptakes by rat peyer´s patches following oral administration. **Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 8, p. 1228-1231, 1993.

ARCANJO, D. D. Bioactivity evaluation against Artemia salina Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. **Brazilian Journal of Biology,** v. 72, n. 3, p. 505-9, 2012.

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

AZEREDO, J.; AZEVEDO, N. F.; BRIANDET, R.; CERCA, N.; COENYE, T.; COSTA, A. R.; DESVAUX, M.; BONAVENTURA, G.; HÉBRAUD, M.; JAGLIC, Z.; KAČÁNIOVÁ, M.; KNØCHEL, S.; LOURENÇO, A.; MERGULHÃO, F.; MEYER, R. L.; NYCHAS, G.; SIMÕES, M.; TRESSE, O.; STERNBERG, C. Critical review on biofilm methods. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 313–351, 2017.

BAUAB, T. M. **Prospecção de bioativos com potencial antimicrobiano**. 2017. 669 f. Tese (Livre Docência) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2017.

BHARALI, D. J.; SIDDIQUI, I. A.; ADHAMI, V. M.; CHAMCHEU, J. C.; ALDAHMASH, A. M.; MUKHTAR, H.; MOUSA, S. A. Nanoparticle Delivery of Natural Products in the Prevention and Treatment of Cancers: Current Status and Future Prospects. **Cancers**, v. 3, n. 4, p. 4024–4045, 2011.

BIZERRA, F. C.; JIMENEZ-ORTIGOSA, C.; SOUZA, A. C. R.; BREDA, G. L.; QUEIROZ-

TELLES, F.; PERLIN, D. S.; COLOMBO, A. L. Breakthrough candidemia due to multidrug-resistant *Candida glabrata* during prophylaxis with a low dose of micafungin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 4, p. 2438–2440, 2014.

BIZIUK, M. Solid Phase Extraction Technique – Trends , Opportunities and Applications. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 15, n. 5, p. 677–690, 2006.

BJARNSHOLT, T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. **APMIS**, v. 121, n. 136, p. 1–58, 2013.

BLECHER, K.; NASIR, A.; FRIEDMAN, A. The growing role of nanotechnology in combating infectious disease. **Virulence**, v. 2, n. 5, p. 395–401, 2011.

BOIKOV, D. A.; LOCKE, J. B.; JAMES, K. D.; BARTIZAL, K.; SOBEL, J. D. In vitro activity of the novel echinocandin CD101 at pH 7 and 4 against *Candida* spp. isolates from patients with vulvovaginal candidiasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 5, p. 1355–1358, 2017.

BONIFÁCIO, B. V. **Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos hidroetanólicos de *Astronium* sp incorporados ou não em sistemas nanoestruturados**. 2014. 99 f. Dissertaçcão (Mestrado em Ciências Farmcêuticas). Faculdade de Ciencias Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2014.

BONIFÁCIO, B. V.; RAMOS, M. A. S.; SILVA, P. B.; NEGRI, K. M. S.; OLIVEIRA, E. L. ; SOUZA, L. P.; VILEGAS, W.; PAVAN, F. R.; CHORILLI, M.; BAUAB, T. M. Nanostructured lipid system as a strategy to improve the anti-*Candida albicans* activity of *Astronium* sp. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 5081–5092, 2015.

BONIFÁCIO, B. V.; SILVA, P. B.; RAMOS, M. A. S.; NEGRI, K. M. S.; BAUAB, T. M.; CHORILLI, M. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: A review. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2014.

BROWN, G. D.; DENNING, D. W.; GOW, N. A. R.; LEVITZ, S. M.; NETEA, M. G.; WHITE, T. C. Hidden Killers: Human Fungal Infections. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 165, p. 165rv13-165rv13, 2012.

BRUM, A. A. S.; ARRUDA, L. F.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Metodo De Extração E Qualidade Da Fração Lipidica De Materias-Primas De Origem Vegetal E Animal. **Quimica Nova**, v. 32, n. 4, p. 849–854, 2009.

BURMØLLE, M.; REN, D.; BJARNSHOLT, T.; SØRENSEN, S. J. Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter? **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 2, p. 84–91, 2014.

BUSSCHER, H. J.; MEI, H. C. VAN DER. Microbial Adhesion in Flow Displacement Systems. **Clinical Microbiology reviews,** v. 19, n. 1, p. 127–141, 2006.

BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. **Natural Product Reports**, v. 25, n. 3, p. 475, 2008.

CARRARA, M. A.; DONATTI, L.; DAMKER, E.; SVIDIZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L.; BATISTA, M. R. A new model of vaginal infection by *Candida albicans* in rats. **Mycopathologia,** v. 170, n. 5, p. 331-338, Nov 2010.

CAGGIANO, G.; CORETTI, C.; BARTOLOMEO, N.; LOVERO, G.; GIGLIO, O. DE; MONTAGNA, M. T. *Candida* Bloodstream Infections in Italy: Changing Epidemiology during 16 Years of Surveillance. **BioMed Research International**, v. 2015, n. January 1998, p. 1–9, 2015.

CALDERONE, R.; FONZI, W. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends in microbiology**, v. 9, n. 7, p. 327–35, 2001.

CALIXTO, G. M. F. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas nanoestruturados bioadesivos contendo peptídeo análogo à adesina do *Streptococcus mutans***. 2013. 105 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, 2013.

CALVO, P.; REMUNAN-LOPEZ, C.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Development of positively charged colloidal drug carriers: chitosan-coated polyester nanocapsules and submicron-emulsions Colloid Polym. Sci. v. 275, n. 46, 1997.

CAMPION, E. W.; KULLBERG, B. J.; ARENDRUP, M. C. Invasive Candidiasis. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 15, p. 1445–1456, 2015.

CANDIRACCI, M.; CITTERIO, B.; PIATTI, E. Antifungal activity of the honey flavonoid extract against Candida albicans. **Food Chemistry**, v. 131, n. 2, p. 493–499, 2012.

CANUTO, M. M.; RODERO, F. G. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. **Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 9, p. 550–563, 2002.

CASANOVA, L. M.; SILVA, D. DA; SOLA-PENNA, M.; MAGALHÃES CAMARGO, L. M. DE; MOURA CELESTRINI, D. DE; TINOCO, L. W.; COSTA, S. S. Identification of chicoric acid as a hypoglycemic agent from Ocimum gratissimum leaf extract in a biomonitoring in vivo study. **Fitoterapia**, v. 93, p. 132–141, 2014.

CASSONE, A.; SOBEL, J. D. Experimental models of vaginal candidiasis and their relevance to human candidiasis. **Infection and Immunity**, v. 84, n. 5, p. 1255–1261, 2016.

CATUOGNO, C.; JONES, M. N. The antibacterial properties of solid supported liposomes on Streptococcus oralis biofilms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 257, n. 1–2, p. 125–140, 2003.

CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P. K.; GHANNOUM, M. A. *Candida* biofilms associated with CVC and medical devices. **Mycoses**, v. 55, n. SUPPL.1, p. 46–57, 2012.

CHEN, H.; FUJITA, M.; FENG, Q.; CLARDY, J.; FINK, G. R. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 14, p. 5048–5052, 2004.

CLSI. **Manual Clinical and Laboratory Standards Institute**. Reference methods for broth dilution antifungal susceptibility tests for yeasts; approved standards, CLSI document M27-A3,Wayne, PA., 2008.

CLSI. **Manual Clinical and Laboratory Standards Institute**. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standards- 6ª ed. Document M7-A6 performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2006.

COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R.; LAPPIN-SCOTT, H. M. Microbial biofilms. **Annual review of microbiology**, v. 49, p. 711–45, 1995.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, 2013.

CRAGG, G. M.; PEZZUTO, J. M. Natural Products as a Vital Source for the Discovery of Cancer Chemotherapeutic and Chemopreventive Agents. **Medical Principles and Practice**, v. 25, n. 2, p. 41–59, 2016.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, n. 5, p. 343–356, 2005.

D'ACUNTO, B.; FRUNZO, L.; KLAPPER, I.; MATTEI, M. R. Modeling multispecies biofilms including new bacterial species invasion. **Mathematical Biosciences**, v. 259, p. 20–26, 2015.

DAESCHEL, M. A.; MCGUIRE, J.; AL-MAKHLAFI, H. Antimicrobial activity of nisin adsorbed to hydrophilic and hydrophobic silicon surfaces. **J. Food Prot.**, v. 55, n. 9, p. 731–735, 1992.

DICHTL, K.; EBEL, F.; DIRR, F.; ROUTIER, F. H.; HEESEMANN, J.; WAGENER, J. Farnesol misplaces tip-localized Rho proteins and inhibits cell wall integrity signalling in Aspergillus fumigatus. **Molecular Microbiology**, v. 76, n. 5, p. 1191–1204, 2010.

DICICCO, M.; NEETHIRAJAN, S.; SINGH, A.; WEESE, J. Efficacy of clarithromycin on biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. **BMC Veterinary Research**, v. 8, n. 1, p. 225, 2012.

DING, W.-Y.; LI, Y.-H.; LIAN, H.; AI, X.-Y.; ZHAO, Y.-L.; YANG, Y.-B.; HAN, Q.; LIU, X.; CHEN, X.-Y.; HE, Z. Sub-Minimum Inhibitory Concentrations of Rhubarb Water Extracts Inhibit *Streptococcus suis* Biofilm Formation. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. July, p. 1–9, 2017.

DOI, A. M.; PIGNATARI, A. C. C.; EDMOND, M. B.; MARRA, A. R.; CAMARGO, L. F. A.; SIQUEIRA, R. A.; MOTA, V. P. DA; COLOMBO, A. L. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. **PloS one**, v. 11, n. 1, p. e0146909, 2016.

DOUGLAS, L. J. *Candida* biofilms and their role in infection. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 30–36, 2003.

DOVNIK, A.; GOLLE, A.; NOVAK, D.; ARKO, D.; TAKAČ, I. Treatment of vulvovaginal candidiasis: A review of the literature. **Acta Dermatovenerologica Alpina, Pannonica et Adriatica**, v. 24, n. 1, p. 5–7, 2015.

DUMITRU, R.; HORNBY, J. M.; KENNETH, W.; NICKERSON, K. W. Defined Anaerobic Growth Medium for Studying *Candida albicans* Basic Biology and Resistance to Eight Antifungal Drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 7, p. 2350–2354, 2004.

DUNNE, W. M. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 155–166, 2002.

CASTRO, R. D; DE SOUZA T. M; BEZERRA L. M; FERREIRA, G. L; COSTA E. M, CAVALCANTI, A. L. Antifungal activity and mode of action of thymol and its synergism with nystatin against Candida species involved with infections in the oral cavity: an in vitro study. **BMC Complementary and Alternative Medicine**., v. 15, p. 1-7, 2015

COSTA, G. M.; ENDO, E. H.; CORTEZ, D. A. G.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Effect of plant extracts on planktonic growth and biofilm of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 4, n.6, p. 908-917, 2015.

ELOY, J. O. et al. Co-loaded paclitaxel/rapamycin liposomes: Development, characterization and in vitro and in vivo evaluation for breast cancer therapy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 141, p. 74–82, 2016.

ENJALBERT, B.; WHITEWAY, M. Release from Quorum-Sensing Molecules Triggers Hyphal Formation during Candida albicans Resumption of Growth. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 7, p. 1203–1210, 2005.

EVERAERT, E. P. J. M.; MEI, H. C. VAN DER; BUSSCHER, H. J. Adhesion of yeasts and bacteria to fluoro-alkylsiloxane layers chemisorbed on silicone rubber. **Colloids B and Surfaces** v. 10, p. 179–190, 1998.

FERNÁNDEZ-CAMPOS, F.; CLARES NAVEROS, B.; LÓPEZ SERRANO, O.; ALONSO MERINO, C.; CALPENA CAMPMANY, A. C. Evaluation of novel nystatin nanoemulsion for skin candidosis infections. **Mycoses**, v. 56, n. 1, p. 70–81, 2013.

FICHINO, B.; FIDELIS, A.; SCHMIDT, I.; PIVELLO, V. Efeitos de altas temperaturas na germinação de sementes de capim-dourado (*Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland, Eriocaulaceae): implicações para o manejo. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, n. 2, p. 508–511, 2012.

FLEMMING, H.-C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623–33, 2010.

FUX, C. A.; COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; STOODLEY, P. Survival strategies of infectious biofilms. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 34–40, 2005.

GALLUCCI, M. N.; CAREZZANO, M. E.; OLIVA, M. M.; DEMO, M. S.; PIZZOLITTO, R. P.; ZUNINO, M. P.; ZYGADLO, J. A.; DAMBOLENA, J. S. In vitro activity of natural phenolic compounds against fluconazole-resistant *Candida* species: A quantitative structure-activity relationship analysis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 4, p. 795–804, 2014.

GARRETT, T. R.; BHAKOO, M.; ZHANG, Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**, v. 18, n. 9, p. 1049–1056, 2008.

GEMMILL, J. A. L.; STRATTON, P.; CLEARY, S. D.; BALLWEG, M. LOU; SINAII, N. Cancers, infections, and endocrine diseases in women with endometriosis. **Fertility and Sterility**, v. 94, n. 5, p. 1627–1631, 2010.

GHARENAGHADEH, S.; KARIMI, N.; FORGHANI, S.; NOURAZARIAN, M.; GHAREHNAGHADEH, S.; JABBARI, V.; KHIABANI, M. S.; KAFIL, H. S. Application of *Salvia multicaulis* essential oil-containing nanoemulsion against food-borne pathogens. **Food Bioscience**, v. 19, p. 128–133, 2017.

GHOSH, V.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Eugenol-loaded antimicrobial nanoemulsion preserves fruit juice against, microbial spoilage. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 114, p. 392–397, 2014.

GHOSH, V.; SARANYA, S.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Antibacterial microemulsion prevents sepsis and triggers healing of wound in wistar rats. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 105, p. 152–157, 2013.

GILBERT, P.; ALLISON, D. G.; MCBAIN, A. J. Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance? **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n. s1, p. 98S–110S, 2002.

GIULIETTI, A. M.; ANDRADE, M. J. G.; SCATENA, V. L.; TROVÓ, M.; COAN, A. I.; SANO, P. T.; SANTOS, F. A. R.; BORGES, R. L. B.; BERG, C. VAN DEN. Molecular phylogeny, morphology and their implications for the taxonomy of Eriocaulaceae. **Rodriguesia**, v. 63, n. 1, p. 1–19, 2012.

GIULIETTI, N.; GIULIETTI, A. M.; PIRANI, J. R.; MENEZES, N. L. Estudos Em Sempre-Vivas: Importancia Economica Do Extrativismo Em Minas Gerais, Brasil. (1). **Acta Botanica Brasileira**, v. 1, n. 2, p. 179–193, 1988.

GONÇALVES, B.; FERREIRA, C.; ALVES, C. T.; HENRIQUES, M.; AZEREDO, J.; SILVA, S. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, n. 6, p. 905–927, 2016.

GOW, N. A. R.; VEERDONK, F. L. VAN DE; BROWN, A. J. P.; NETEA, M. G. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 112–122, 2011.

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

GUPTA, A.; ERAL, H. B.; HATTON, T. A.; DOYLE, P. S. Nanoemulsions: formation, properties and applications. **Soft Matter**, v. 12, n. 11, p. 2826–2841, 2016.

GUSNANIAR, N.; SJOLLEMA, J.; NURYASTUTI, T.; PETERSON, B. W.; BELT-GRITTER, B. VAN DE; JONG, E. D. DE; MEI, H. C. VAN DER; BUSSCHER, H. J. Structural changes in S. epidermidis biofilms after transmission between stainless steel surfaces. **Biofouling**, v. 33, n. 9, p. 712–721, 2017.

GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A. Natural products as antimicrobial agents. **Food Control**, v. 46, p. 412–429, 2014.

HABIMANA, O.; SEMIÃO, A. J. C.; CASEY, E. The role of cell-surface interactions in bacterial initial adhesion and consequent biofilm formation on nanofiltration/reverse osmosis membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 454, p. 82–96, 2014.

HARRIOTT, M. M.; NOVERR, M. C. Importance of *Candida*-bacterial polymicrobial biofilms in disease. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 11, p. 557–563, 2011.

HASAN, M. **Nanotechnology drug delivery system: tools in advance pharmaceutical & human health care**. n. November, 2016.

HELENA, B.; PANARIELLO, D.; ATEM, C.; ARAÚJO, G. DE; PAVARINA, A. C.; SANTIAGO, S. L.; DUARTE, S. Advances and Challenges in Oral Biofilm Control. **Current Oral Health Reports**, 2017.

FEUERSCHUETTE, O.; KOETTKER, S.; FEUERSCHUETTE, I.; CORRÊA, T.; GRANDO, L.; TREPANI, A. Candidíase vaginal recorrente: manejo clínico. **Femina**, v. 38 n^{o} 2, p. 32, 2010.

HERWALD, S. E.; KUMAMOTO, C. A. *Candida albicans* Niche Specialization: Features That Distinguish Biofilm Cells from Commensal Cells. **Current Fungal Infection Reports**, v. 8, n. 2, p. 179–184, 2014.

HEYDORN, A.; ERSBOLL, B. K.; HENTZER, M.; PARSEK, M. R.; GIVSKOV, M.; MOLIN, S. Experimental reproducibility in flow-chamber biofilms. **Microbiology**, v. 146, n. 10, p. 2409–2415, 2000.

HILARIO, F.; CHAPLA, V. M.; ARAUJO, A. R.; SANO, P.; BAUAB, T. M.; SANTOS, L. C. Antimicrobial Screening of Endophytic Fungi Isolated from the Aerial Parts of. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 8, p. 1389–1395, 2017.

HØIBY, N.; CIOFU, O.; JOHANSEN, H. K.; SONG, Z.; MOSER, C.; JENSEN, P. Ø.;

MOLIN, S.; GIVSKOV, M.; TOLKER-NIELSEN, T.; BJARNSHOLT, T. The clinical impact of bacterial biofilms. **International Journal of Oral Science**, v. 3, n. 2, p. 55–65, 2011.

HOOG, M.; RAST, T. J.; MARTCHENKO, M.; GRINDLE, S.; DIGNARD, D.; HOGUES, H.; CUOMO, C.; BERRIMAN, M.; SCHERER, S.; MAGEE, B.; WHITEWAY, M.; CHIBANA, H.; NANTEL, A.; MAGEE, P. Assembly of the *Candida albicans* genome into sixteen supercontigs aligned on the eight chromosomes. **Genome Biology**, v. 8, n. 4, p. R52, 2007.

HORNBY, J. M.; JENSEN, E. C.; LISEC, A. D.; TASTO, J. J.; JAHNKE, B.; SHOEMAKER, R.; DUSSAULT, P.; NICKERSON, K. W. Quorum Sensing in the Dimorphic Fungus *Candida albicans* Is Mediated by Farnesol. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 2982–2992, 2001.

HUFFNAGLE, G. B.; NOVERR, M. C. The emerging world of the fungal microbiome. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 7, p. 334–341, 2013.

HUYAN, X. H.; LIN, Y.; CHEN, T. G. R.; FAN, Y. Immunosuppressive effect of cyclophosphamide on white blood cells and lymphocyte subpopulations from peripheral blood of Balb/c mice. **International Journal of Immunopharmacology,** v. 11, n. 9, p. 1293-1297, 2011.

HYUN, H. K.; SALEHI, S.; FERRACANE, J. L. Biofilm formation affects surface properties of novel bioactive glass-containing composites. **Dental Materials**, v. 31, n. 12, p. 1599–1608, 2015.

JAHID, I. K.; MIZAN, M. F. R.; HA, A. J.; HA, S. DO. Effect of salinity and incubation time of planktonic cells on biofilm formation, motility, exoprotease production, and quorum sensing of Aeromonas hydrophila. **Food Microbiology**, v. 49, p. 142–151, 2015.

JANJUA, S. A.; PASTAR, Z.; IFTIKHAR, N.; AMMAD, S. Intertriginous eruption induced by terbinafine: a review of baboon syndrome. **International Journal of Dermatology**, v. 56, n. 1, p. 100–103, 2017.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida : Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 13–25, 2010.

JOUNG, D. K.; KANG, O. H.; SEO, Y. S.; ZHOU, T.; LEE, Y. S.; HAN, S. H.; MUN, S. H.; KONG, R.; SONG, H. J.; SHIN, D. W.; KWON, D. Y. Luteolin potentiates the effects of aminoglycoside and β-lactam antibiotics against methicillin-resistant Staphylococcus aureus in vitro. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 11, n. 6, p. 2597–2601, 2016.

JULKUNEN-TIITTO, R.; NENADIS, N.; NEUGART, S.; ROBSON, M.; AGATI, G.; VEPSÄLÄINEN, J.; ZIPOLI, G.; NYBAKKEN, L.; WINKLER, B.; JANSEN, M. A. K. Assessing the response of plant flavonoids to UV radiation: an overview of appropriate techniques. **Phytochemistry Reviews**, v. 14, n. 2, p. 273–297, 2015.

KALAM, M. A.; ALSHAMSAN, A.; ALJUFFALI, I. A.; MISHRA, A. K.; SULTANA, Y.

Delivery of gatifloxacin using microemulsion as vehicle: Formulation, evaluation, transcorneal permeation and aqueous humor drug determination. **Drug Delivery**, v. 23, n. 3, p. 896–907, 2016.

KOPP, B. Herbal medicinal products and phytotherapy—a thematic issue. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, v. 167, n. 7–8, p. 145–146, 2017.

LAM, P.; KOK, S. H. L.; LEE, K. K. H.; LAM, K. H.; HAU, D. K. P.; WONG, W. Y.; BIAN, Z.; GAMBARI, R.; CHUI, C. H. Sensitization of *Candida albicans* to terbinafine by berberine and berberrubine. **Biomedical reports**, v. 4, n. 4, p. 449–452, 2016.

LEID, J. G.; DITTO, A. J.; KNAPP, A.; SHAH, P. N.; WRIGHT, B. D.; BLUST, R.; CHRISTENSEN, L.; CLEMONS, C. B.; WILBER, J. P.; YOUNG, G. W.; KANG, A. G.; PANZNER, M. J.; CANNON, C. L.; YUN, Y. H.; YOUNGS, W. J.; SECKINGER, N. M.; COPE, E. K. In vitro antimicrobial studies of silver carbene complexes: Activity of free and nanoparticle carbene formulations against clinical isolates of pathogenic bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 1, p. 138–148, 2012.

LEONHARDT, I.; SPIELBERG, S.; WEBER, M.; ALBRECHT-ECKARDT, D.; BLÄSS, M.; CLAUS, R.; BARZ, D.; SCHERLACH, K.; HERTWECK, C.; LÖFFLER, J.; HÜNNIGER, K.; KURZAI, O. The fungal quorum-sensing molecule farnesol activates innate immune cells but suppresses cellular adaptive immunity. **mBio**, v. 6, n. 2, p. e00143-15, 2015.

LEVENTHAL, G. E.; HILL, A. L.; NOWAK, M. A.; BONHOEFFER, S. Evolution and emergence of infectious diseases in theoretical and real-world networks. **Nature communications**, v. 6, p. 6101, 2015.

LIN, T.-C.; HUNG, K.-H.; PENG, C.-H.; LIU, J.-H.; WOUNG, L.-C.; TSAI, C.-Y.; CHEN, S.-J.; CHEN, Y.-T.; HSU, C.-C. Nanotechnology-based drug delivery treatments and specific targeting therapy for age-related macular degeneration. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 78, n. 11, p. 635–641, 2015.

LIU, Y.; FILLER, S. C. *Candida albicans* Als3, a multifunctional adhesin and invasion. **Eukaryot. Cell**., v. 10, n. 2, p. 168-173, 2011.

LOHSE, M. B.; GULATI, M.; JOHNSON, A. D.; NOBILE, C. J. Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, p.1-13, 2017.

LÓPEZ-LÁZARO, M. Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 9, n. 1, p. 31–59, 2009.

MAERTENS, J. A. History of the development of azole derivatives. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, p. 1–10, 2004.

MAGILL, S. S.; EDWARDS, J. R.; BAMBERG, W.; BELDAVS, Z. G.; DUMYATI, G.; KAINER, M. A.; LYNFIELD, R.; MALONEY, M.; MCALLISTER-HOLLOD, L.; NADLE, J.; RAY, S. M.; THOMPSON, D. L.; WILSON, L. E.; FRIDKIN, S. K. Multistate Point-Prevalence Survey of Health Care–Associated Infections. **New England Journal of**

Medicine, v. 370, n. 13, p. 1198–1208, 2014.

MAH, T. F. Biofilm-specific antibiotic resistance. **Future Microbiology**, v. 7, n. 9, p. 1061–1072, 2012.

MAHATO, R. Nanoemulsion as Targeted Drug Delivery System for Cancer Therapeutics. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Pharmacology**, v. 3, n. 2, p. 83–97, 2017.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 4a, p. 609–614, 2002.

MARCOS-ZAMBRANO, L. J.; ESCRIBANO, P.; BOUZA, E.; GUINEA, J. Production of biofilm by *Candida albicans* and non-*Candida* spp. isolates causing fungemia: Comparison of biomass production and metabolic activity and development of cut-off points. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, n. 8, p. 1192–1198, 2014.

MATEUS, C.; CROW, S. A.; AHEARN, D. G. Adherence of *Candida albicans* to Silicone Induces Immediate Enhanced Tolerance to Fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 9, p. 3358–3366, 2004.

MATHESON, A.; MAZZA, D. Recurrent vulvovaginal candidiasis: A review of guideline recommendations. **Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 57, n. 2, p. 139–145, 2017.

MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119–128, 2013.

MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, v. 8, n. 6, p. 1719–1729, 2012.

MCCULLOUGH, M. J.; ROSS, B. C.; READE, P. C. *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 25, n. 2, p. 136–144, 1996.

MICELI, M. H.; DÍAZ, J. A.; LEE, S. A. Emerging opportunistic yeast infections. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 142–151, 2011.

MITCHELL, K. F.; ZARNOWSKI, R.; SANCHEZ, H.; EDWARD, J. A.; REINICKE, E. L.; NETT, J. E.; MITCHELL, A. P.; ANDES, D. R. Community participation in biofilm matrix assembly and function. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 13, p. 4092–4097, 2015.

MITRA, A.; DEY, B. Chitosan microspheres in novel drug delivery systems. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences,** v. 73, n. 4, p. 355-366, 2011.

MOUDGAL, V. V; SOBEL, J. D. Antifungal drugs in pregnancy: a review. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 2, n. 5, p. 475–483, 2003.

MUKAREMERA, L.; LEE, K. K.; MORA-MONTES, H. M.; GOW, N. A. R. Candida albicans yeast, pseudohyphal, and hyphal morphogenesis differentially affects immune recognition. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. JUN, p. 1–12, 2017.

MURCIANO, C.; MOYES D. L.; RUNGLALL M.; TOBOUTI P.; ISLAM A.; HOYER L.L.; NAGLIK J. R. Evaluation of the role of *Candida albicans* Agglutinin - Like Sequence (Als) proteins in human oral epithelial cell interactions. **PLos One**, v. 7, n. 3, p. 1-9, 2012.

NAILIS, H.; COENYE, T.; VAN NIEUWERBURGH, F.; DEFORCE, D.; NELIS H. J. Development and evaluation of different normalization strategies for gene expression studies in *Candida albicans* biofilms by real-time PCR. **BMC Mol. Biol.**., v. 4, p.25, 2006.

NAPPI, R. E.; LIEKENS, G.; BRANDENBURG, U. Attitudes, perceptions and knowledge about the vagina: the International Vagina Dialogue Survey. **Contraception**, v. 73, n. 5, p. 493–500, 2006.

NASTITI, C. M. R. R.; PONTO, T.; ABD, E.; GRICE, J. E.; BENSON, H. A. E.; ROBERTS, M. S. Topical nano and microemulsions for skin delivery. **Pharmaceutics**, v. 9, n. 4, p. 1–25, 2017.

NETEA, M. G.; JOOSTEN, L. A. B.; MEER, J. W. M. VAN DER; KULLBERG, B.-J.; VEERDONK, F. L. VAN DE. Immune defence against *Candida* fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 10, p. 630–642, 2015.

NETT, J. E.; ANDES, D. R. Fungal Biofilms: In Vivo Models for Discovery of Anti-Biofilm Drugs. *In*: **Microbial Biofilms, 2nd Edition**. American Society of Microbiology. v. 3p. 33–49.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311–335, 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.

NN, A. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. **Medicinal & Aromatic Plants**, v. 4, n. 3, p. 3–8, 2015.

NOBILE, C. J.; JOHNSON, A. D. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. **Annual Review of Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 71–92, 2015.

NOBLE, S. M.; GIANETTI, B. A.; WITCHLEY, J. N. *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 96–108, 2016.

NUNES, B. S.; CARVALHO, F. C.; GUILHERMINO, L. M.; VAN STAPPEN, G. Use of the genus Artemia in ecotoxicity testing. **Environ Pollut,** v. 144, n. 2, p. 453-62, 2006.

NURYASTUTI, T.; MEI, H. C.; BUSSCHER, H. J.; ROEL, K.; ABU, T. A.; BASTIAAN, P. K. RecA mediated spontaneous deletions of the icaADBC operon of clinical *Staphylococcus*

epidermidis isolates: a new mechanism of phenotypic variations. **The Medical journal of Malaysia**, v. 63 Suppl A, p. 97, 2008.

OBEIDAT, W.M.; SCHWABE, K.; MULLER, R.H.; KECH, C.M. Preservation of nanostructured lipid carriers (NLC). **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**., v. 76, p. 56-67, 2010.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual review of microbiology**, v. 54, n. 1, p. 49–79, 2000.

ODDS, F. C.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. Antifungal agents: Mechanisms of action. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 272–279, 2003.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F. DE; PICOLLI, R. H. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos : uma revisão Microbial. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 3, p. 277–284, 2010.

OLIVEIRA, A. P. S.; SOUSA, J. F.; SILVA, M. A.; HILÁRIO, F.; RESENDE, F. A.; CAMARGO, M. S.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C.; VARANDA, E. A. Estrogenic and chemopreventive activities of xanthones and flavones of *Syngonanthus* (Eriocaulaceae). **Steroids**, v. 78, n. 11, p. 1053–1063, 2013.

PACIFICO, M.; NAPOLITANO, A.; MASULLO, M.; HILARIO, F.; VILEGAS, W.; PIACENTE, S.; SANTOS, L. C. Metabolite fingerprint of "capim dourado" (*Syngonanthus nitens*), a basis of Brazilian handcrafts. **Industrial Crops and Products**, v. 33, n. 2, p. 488–496, 2011.

PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, R.; PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, A.; MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, J. New strategies for local treatment of vaginal infections. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 92, p. 105–122, 2015.

PELGRIFT, R. Y.; FRIEDMAN, A. J. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 13–14, p. 1803–1815, 2013.

PÉNZES, T.; CSÓKA, I.; ERŐS, I. Rheological analysis of the structural properties effecting the percutaneous absorption and stability in pharmaceutical organogels. **Rheologica Acta.** v. 43, p. 457-463, 2004.

PERCIVAL, S. L. Importance of biofilm formation in surgical infection. **Britsh Journal of Surgery**, v.104, n.2, , p. 85–94, 2017.

PESTANA, K. C. **Microemulsões biocompatíveis de anfotericina B para administração oral estudo estrutural, liberação in vitro e farmacocinética pré-clínica**. 2009. 109 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)– Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita filho, 2009.

PERCIVAL, S. L.; KNAPP, J. S.; EDYVEAN, R. G. J.; WALES, D. S. Biofilms, mains water and stainless steel. **Water research**, v. 32, n. 7, p. 2187–2201, 1998.

PERLIN, D. S. Mechanisms of echinocandin antifungal drug resistance. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1354, n. 1, p. 1–11, 2015.

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: Mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **American Journal of Medicine**, v. 125, n. 1 SUPPL., p. S3–S13, 2012.

PINTO REIS, C.; NEUFELD, R. J.; RIBEIRO, A. J.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 8–21, 2006.

POOLE, C. F. Thin-layer chromatography: Challenges and opportunities. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n. 1–2, p. 963–984, 2003.

PRADEEPA, K.; KRISHNA, V.; HARISH, B. G.; R, S. K. S.; K, G. K. Antibacterial activity of leaf extract of Delonix elata and molecular docking studies of luteolin. **Journal of Biochemical Technology**, v. 3, p. S193-S197, 2012.

QADIR, M. A.; SHAHZADI, S. K.; BASHIR, A.; MUNIR, A.; SHAHZAD, S. Evaluation of Phenolic Compounds and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Some Common Herbs. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2017, p. 1-6, 2017.

QIN, S. Y.; ZHANG, A. Q.; CHENG, S. X.; RONG, L.; ZHANG, X. Z. Drug self-delivery systems for cancer therapy. **Biomaterials**, v. 112, p. 234–247, 2017.

RAJABI, S. ALI R.; MEHRDAD, H.; TAHEREH N. *Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences,** v. 23, n. 1, 2015.

RAJENDRAN, R.; RADHAI, R.; KOTRESH, T. M.; CSISZAR, E. Development of antimicrobial cotton fabrics using herb loaded nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 2, p. 613–617, 2013.

RAMAGE, G.; MOWAT, E.; JONES, B.; WILLIAMS, C.; LOPEZ-RIBOT, J. Our Current Understanding of Fungal Biofilms. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 340–355, 2009.

RAMAGE, G.; RAJENDRAN, R.; SHERRY, L.; WILLIAMS, C. Fungal Biofilm Resistance. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, p. 1–14, 2012.

RAMOS, M. A. S. ***Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland: Caracterização biológica e prospecção terapêutica do extrato metanólico incorporado ou não em sistema nanoestruturado para aplicação no tratamento da candidíase vulvovaginal**. 2015. 169 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2015.

RAMOS, M. A. S.; CALIXTO, G.; TOLEDO, L. G.; BONIFÁCIO, B. V.; SANTOS, L. C. DO; ALMEIDA, M. T. G.; CHORILLI, M.; BAUAB, T. M. Liquid crystal precursor mucoadhesive system as a strategy to improve the prophylactic action *of Syngonanthus nitens*

(Bong.) Ruhland against infection by *Candida krusei*. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 7455–7466, 2015.

RAMOS, M. A. S.; TOLEDO, L. G.; CALIXTO, G. M. F.; BONIFÁCIO, B. V.; ARAÚJO, M. G. F.; SANTOS, L. C.; ALMEIDA, M. T. G.; CHORILLI, M.; BAUAB, T. M. *Syngonanthus nitens* Bong. (Rhul.)-loaded nanostructured system for Vulvovaginal candidiasis treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 8, 2016.

RAMOS, M. A. S.; SILVA, P. B.; SPÓSITO L., TOLEDO, L. G.; BONIFÁCIO, B. V.; RODERO, C. F.; SANTOS, K. C.; CHORILLI, M. BAUAB, T. M. Nanotechnology based Drug Delivery Systems for Control of Microbial Biofilms: A Review. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 1179-121, 2018.

RANE, H. S.; BERNARDO, S. M.; RAINES, S. M.; BINDER, J. L.; PARRA, K. J.; LEE, S. A. *Candida albicans* VMA3 is necessary for V-ATPase assembly and function and contributes to secretion and filamentation. **Eukaryotic Cell**, v. 12, n. 10, p. 1369–1382, 2013.

RAVANI, L.; ESPOSITO, E.; BORIES, C.; MOAL, V. L. LE; LOISEAU, P. M.; DJABOUROV, M.; CORTESI, R.; BOUCHEMAL, K. Clotrimazole-loaded nanostructured lipid carrier hydrogels: Thermal analysis and in vitro studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 454, n. 2, p. 695–702, 2013.

REEF, S. E.; LEVINE, W. C.; MC NEIL, M. M.; FISHER-HOCH, S.; HOLMBERG, S. D.; DUERR, A.; SMITH, D.; SOBEL, J. D.; PINNER, R. W. Treatment options for Vulvovaginal Candidiasis, 1993. **Clinical Infectious Diseases**, v. 20, n. Suppl 1, p. 80–90, 1995.

RENSLO, A. R. The Echinocandins: Total and Semi-Synthetic Approaches in Antifungal Drug Discovery. **Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 3, p. 201–212, 2007.

RIBEIRO, A. P. D.; ANDRADE, M. C.; BAGNATO, V. S.; VERGANI, C. E.; PRIMO, F. L.; TEDESCO, A. C.; PAVARINA, A. C. Antimicrobial photodynamic therapy against pathogenic bacterial suspensions and biofilms using chloro-aluminum phthalocyanine encapsulated in nanoemulsions. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 2, p. 549–559, 2015.

RIBEIRO, A. P. D.; ANDRADE, M. C.; SILVA, J. F.; JORGE, J. H.; PRIMO, F. L.; TEDESCO, A. C.; PAVARINA, A. C. Photodynamic inactivation of planktonic cultures and biofilms of *Candida albicans* mediated by aluminum-chloride-phthalocyanine entrapped in nanoemulsions. **Photochemistry and Photobiology**, v. 89, n. 1, p. 111–119, 2013.

RIZZELLO, L.; CINGOLANI, R.; POMPA, P. P. Nanotechnology tools for antibacterial materials R eview. v. 8, p. 807–821, 2013.

ROMANÍ, A. M.; FUND, K.; ARTIGAS, J.; SCHWARTZ, T.; SABATER, S.; OBST, U. Relevance of polymeric matrix enzymes during biofilm formation. **Microbial Ecology**, v. 56, n. 3, p. 427–436, 2008.

RÖMLING, U.; KJELLEBERG, S.; NORMARK, S.; NYMAN, L.; UHLIN, B. E.; ÅKERLUND, B. Microbial biofilm formation: a need to act. **Journal of Internal Medicine**,

v. 276, n. 2, p. 98–110, 2014.

RUSSELL, W.; DUTHIE, G. Plant secondary metabolites and gut health: the case for phenolic acids. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 70, n. 3, p. 389–396, 2011.

SADEKUZZAMAN, M.; YANG, S.; MIZAN, M. F. R.; HA, S. D. Current and Recent Advanced Strategies for Combating Biofilms. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 14, n. 4, p. 491–509, 2015.

SAMPAIO, M. B.; SCHMIDT, I. B.; FIGUEIREDO, I. B.; SANO, P. T. **Boas Práticas de Manejo para o extrativismo sustentável do capim dourado e buriti**. [s.l: s.n.], 2011. 72p.

SARDI, J. D. C. O.; PITANGUI, N. D. S.; RODRÍGUEZ-ARELLANES, G.; TAYLOR, M. L.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Highlights in pathogenic fungal biofilms. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 31, n. 1, p. 22–29, 2014.

SARKER, D. K. Engineering of Nanoemulsions for Drug Delivery. **Current Drug Delivery**, v. 2, p. 297–310, 2005.

SAVIC, S.; LUKIC, M.; JAKSIC, I.; REICHL, S.; TAMBURIC, S.; GOYMANN, C.M. An alkyl polyglucoside-mixed emulsifier as stabilizer of emulsion systems: The influence of colloidal structure on emulsions skin hydration potential. **Journal of Coloids and Interface Sciences**. v. 358, n. 1, p. 182-191, 2011

SCHEPER, M. A.; SHIRTLIFF, M. E.; MEILLER, T. F.; PETERS, B. M.; JABRA-RIZK, M. A. Farnesol, a Fungal Quorum-Sensing Molecule Triggers Apoptosis in Human Oral Squamous Carcinoma Cells. **Neoplasia**, v. 10, n. 9, p. 954–963, 2008.

SELEEM, D.; PARDI, V.; MURATA, R. M. Review of flavonoids: A diverse group of natural compounds with anti-*Candida albicans* activity in vitro. **Archives of Oral Biology**, v. 76, p. 76–83, 2017.

SEMIGHINI, C. P.; HORNBY, J. M.; DUMITRU, R.; NICKERSON, K. W.; HARRIS, S. D. Farnesol-induced apoptosis in *Aspergillus nidulans* reveals a possible mechanism for antagonistic interactions between fungi. **Molecular Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 753–764, 2006.

SEVKO, A.; FELDMAN, M. S.; KANTERMAN, J.; MICHELS, T.; FALK, C. S.; UMANSKY, L.; RAMACHER, M.; KATO, M.; SCHADENDORF, D.; BANIYASH, M.; UMANSKY, V. Cyclophosphamide promotes chronic inflammation-dependent immunosuppression and prevents antitumor response in melanoma. **Journal of Investigation dermatology.** v. 133, n. 6, p. 1610-1619, 2013.

SHAFAGHAT, A.; PIRFARSHI, F.; SHAFAGHATLONBAR, M. Luteolin derivatives and antimicrobial activity of Achillea tenuifolia Lam. methanol extract. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 533–536, 2014.

SHARIF, S.; KITAZ, A.; AL-KAYALI, R. TLC screening and evaluation of antioxidant,

antibacterial activity of Onopordon macrocephalum by bioautography method. **Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 2, p. 1–8, 2016.

SHARMA, M.; PRASAD, R. The Quorum-Sensing Molecule Farnesol Is a Modulator of Drug Efflux Mediated by ABC Multidrug Transporters and Synergizes with Drugs in *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 10, p. 4834–4843, 2011.

SHEN, B. A New Golden Age of Natural Products Drug Discovery. **Cell**, v. 163, n. 6, p. 1297–1300, 2015.

SHEN, X. FEI; REN, L. BIN; TENG, Y.; ZHENG, S.; YANG, X. LONG; GUO, X. JUAN; WANG, X. YUAN; SHA, K. HUI; LI, N.; XU, G. YA; TIAN, H. WEN; WANG, X. YING; LIU, X. KANG; LI, J.; HUANG, N. Luteolin decreases the attachment, invasion and cytotoxicity of UPEC in bladder epithelial cells and inhibits UPEC biofilm formation. **Food and Chemical Toxicology**, v. 72, p. 204–211, 2014.

SILVA, P. B.; RAMOS, M. A. S.; BONIFÁCIO, B. V.; NEGRI, K. M. S.; SATO, M. R.; BAUAB, T. M.; CHORILLI, M. Nanotechnological Strategies for Vaginal Administration of Drugs—A Review. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 10, n. 9, p. 2218–2243, 2014.

SILVA, P. B.; SOUZA, P.C.; FIORAMONTI CALIXTO, G. M.; LOPES, E. O.; FREM, R. C. G.; NETTO, A. V. G.; MAURO, A. E.; PAVAN, F. R.; CHORILLI, M. In Vitro Activity of Copper(II) Complexes, Loaded or Unloaded into a Nanostructured Lipid System, against *Mycobacterium tuberculosis*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 5, 2016.

SILVA, W. J. DA; SENEVIRATNE, J.; PARAHITIYAWA, N.; ROSA, E. A. R.; SAMARANAYAKE, L. P.; BEL CURY, A. A. DEL. Improvement of XTT assay performance for studies involving Candida albicans biofilms. **Brazilian Dental Journal**, v. 19, n. 4, p. 364–369, 2008.

SILVA, F. A.; PAULA, J. A. M.; SANTOS, P. A.; OLIVEIRA, L. D. A. R.; OLIVEIRA, G. D. A. R.; LIAO, L. M.; PAULA, J. R. DE; SILVA, M. D. R. R. Phytochemical analysis and antimicrobial activity of *Myrcia tomentosa* (Aubl.) DC. leaves. **Molecules**, v. 22, n. 7, p. 1–10, 2017.

SIMÕES, M. Antimicrobial Strategies Effective Against Infectious Bacterial Biofilms. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 14, p. 2129–2145, 2011.

SIMÕES, C. M. O.; SCENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia do produto natural ao medicamento.** v.15, 486 p. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; MACHADO, I.; PEREIRA, M. O.; VIEIRA, M. J. Control of flow-generated biofilms with surfactants: Evidence of resistance and recovery. **Food and Bioproducts Processing**, v. 84, n. 4 C, p. 338–345, 2006.

SINGH, A. V.; VYAS, V.; PATIL, R.; SHARMA, V.; SCOPELLITI, P. E.; LENARDI, C.; GADE, W. N.; MILANI, P.; BONGIORNO, G.; PODESTA, A. Quantitative Characterization of the Influence of the Nanoscale Morphology of Nanostructured Surfaces on Bacterial Adhesion and Biofilm Formation. v. 6, n. 9, 2011.

SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. **Química Orgânica**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001. v. 1, 645 p.

STIDDER, B.; FRAGNETO, G.; ROSER, S.J. Effect of low amounts of cholesterol on the swelling behavior of floating bilayers. **Langmuir**, v. 21, p. 9187 – 9193, 2005.

SOBEL, J. D. Vulvovaginal candidosis. **Lancet**, v. 369, n. 9577, p. 1961–1971, 2007.

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

SOBEL, J. D. Recurrent vulvovaginal candidiasis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 214, n. 1, p. 15–21, 2016a.

SONG, L.; HOU, J.; MEI, H. C. VAN DER; VEEREGOWDA, D. H.; BUSSCHER, H. J.; SJOLLEMA, J. Antimicrobials Influence Bond Stiffness and Detachment of Oral Bacteria. **Journal of Dental Research**, v. 95, n. 7, p. 793-799, 2016.

SOTO, S. M. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. **Virulence**, v. 4, n. 3, p. 223–9, 2013.

SPANAKIS, E. K.; APERIS, G.; MYLONAKIS, E. Reviews Of Anti-infective Agents: New Agents for the Treatment of Fungal Infections: Clinical Efficacy and Gaps in Coverage. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. 8, p. 1060–1068, 2006.

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

STEVENS, K. N. J.; CROES, S.; BOERSMA, R. S.; STOBBERINGH, E. E.; MAREL, C. VAN DER; VEEN, F. H. VAN DER; KNETSCH, M. L. W.; KOOLE, L. H. Hydrophilic surface coatings with embedded biocidal silver nanoparticles and sodium heparin for central venous catheters. **Biomaterials**, v. 32, n. 5, p. 1264–1269, 2011.

SUBRAMANI, R.; NARAYANASAMY, M.; FEUSSNER, K. D. Plant-derived antimicrobials to fight against multi-drug-resistant human pathogens. **3 Biotech**, v. 7, n. 3, p. 1–15, 2017.

SUDBERY, P.; GOW, N.; BERMAN, J. The distinct morphogenic states of Candida albicans. **Trends in Microbiology**, v. 12, n. 7, p. 317–324, 2004.

SUHAJ, M. Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 6–7, p. 531–537, 2006.

TANG, S. X.; MOYES, D. L.; RICHARDSON, J. P.; BLAGOJEVIC, M.; NAGLIK, J. R.

Epithelial discrimination of commensal and pathogenic Candida albicans. **Oral Diseases**, v. 22, p. 114–119, 2016.

TASKER, S. Z.; HERGENROTHER, P. J. Natural products: Taming reactive benzynes. **Nature Chemistry**, v. 9, n. 6, p. 504–506, 2017.

TERUYA, M.; SCATENA, V. L.; THE, S.; SOCIETY, B. Handicrafts from Jalapão (TO), Brazil , and their relationship to plant anatomy Your use of this PDF , the BioOne Web site , and all posted and associated content Handicrafts from Jalapa ˜ o (TO), Brazil , and their relationship to plant anatomy. **Journal of the Torrey Botanical Society**, v. 138, n. 1, p. 34–40, 2011.

TEVYASHOVA, A. N.; OLSUFYEVA, E. N.; SOLOVIEVA, S. E.; PRINTSEVSKAYA, S. S.; REZNIKOVA, M. I.; TRENIN, A. S.; GALATENKO, O. A.; TRESHALIN, I. D.; PEREVERZEVA, E. R.; MIRCHINK, E. P.; ISAKOVA, E. B.; ZOTCHEV, S. B.; PREOBRAZHENSKAYA, M. N. Structure-antifungal activity relationships of polyene antibiotics of the amphotericin B group. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 8, p. 3815–3822, 2013.

THAKUR, N.; GARG, G.; SHARMA, P. K.; KUMAR, N. Nanoemulsions: A Review on Various Pharmaceutical Application. **Global Journal of Pharmacology**, v. 6, n. 3, p. 222–225, 2012.

TIBBITT, M. W.; DAHLMAN, J. E.; LANGER, R. Emerging Frontiers in Drug Delivery. **Journal of the American Chemical Society**, v. 138, n. 3, p. 704–717, 2016.

TJIOE, K. C.; OLIVEIRA, D. T.; GAVARD, J. Luteolin impacts on the DNA damage pathway in oral squamous cell carcinoma. **Nutrition and Cancer**, v. 0.; n. 0.; p. 1-1-, 2016.

TSANG, P. W.-K.; BANDARA, H. M. H. N.; FONG, W.-P. Purpurin Suppresses Candida albicans Biofilm Formation and Hyphal Development. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. e50866, 2012.

TSAO, S.; RAHKHOODAEE, F.; RAYMOND, M. Relative contributions of the *Candida albicans* ABC transporters Cdr1p and Cdr2p to clinical azole resistance. **Antimicrobials Agents and Chemotheraphy**., v. 53, p. 1344-1352, 2009.

VELRAEDS, M. M. C.; MEI, H. C. REIDI, G. BUSSCHER, H. J. Inhibition of Initial Adhesion of Uropathogenic *Enterococcus faecalis* by Biosurfactants from *Lactobacillus* Isolates. **Applied and Environmental Microbiology**. 62, n. 6, p. 1958–1963, 1996.

VIZZOTTO, M.; PEREIRA, M. C. Amora-preta (Rubus sp.): otimização do processo de extração para determinação de compostos fenólicos antioxidantes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 4, p. 1209–1214, 2011.

VUUREN, S. VAN; HOLL, D. Antimicrobial natural product research: A review from a South African perspective for the years 2009–2016. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 208, n. June, p. 236–252, 2017.

WEBSTER, D.; TASCHEREAU, P.; BELLAND, R. J.; SAND, C.; RENNIE, R. P. Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, n. 1, p. 140–146, 2008.

WHALEY, S. G.; BERKOW, E. L.; RYBAK, J. M.; NISHIMOTO, A. T.; BARKER, K. S.; ROGERS, P. D. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-albicans Candida Species. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. JAN, p. 1–12, 2017.

WHITEWAY, M.; BACHEWICH, C. Morphogenesis in *Candida albicans*. **Annual Review of Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 529–553, 2007.

WILCZEWSKA, A. Z.; NIEMIROWICZ, K.; MARKIEWICZ, K. H.; CAR, H. Nanoparticles as drug delivery systems. **Pharmacological Reports**, v. 64, n. 5, p. 1020–1037, 2012.

WÓJCIK, R.; SWIECICKA-GRABOWSKA, G. Reactivity of the immunological system of turkeys vaccinated with the Newcastle virus after intoxication with carbaryl. **Pol. J. Vet. Sci.,** v. 7, n. 1, p. 9-13, 2004.

XAVIER, J. B.; PICIOREANU, C.; ALMEIDA, J. S.; LOOSDRECHT, M. C. M. VAN. Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. **Boletim de Biotecnologia**, v. 76, p. 2–13, 2003.

YANG, Y.; CHEN, M.; GU, J.; ZHU, F.; XU, X.; ZHANG, C.; CHEN, J.; PAN, W.; LIAO, W. Cryptococcosis in kidney transplant recipients in a Chinese university hospital and a review of published cases. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 26, p. 154–161, 2014.

YOSHIJIMA, Y.; MURAKAMI, K.; KAYAMA, S.; LIU, D.; HIROTA, K.; ICHIKAWA, T.; MIYAKE, Y. Effect of substrate surface hydrophobicity on the adherence of yeast and hyphal Candida: Original article. **Mycoses**, v. 53, n. 3, p. 221–226, 2010.

ZAINAL-ABIDIN, M. H.; HAYYAN, M.; HAYYAN, A.; JAYAKUMAR, N. S. New horizons in the extraction of bioactive compounds using deep eutectic solvents: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 979, p. 1–23, 2017.

ZANUTTO, F. A. **Estudo químico e atividades mutagênica e antiradicalar de Paepalanthus chiquitensis Herzog (ERIOCAULACEAE).** 2013. 175f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2013.

ZANUTTO, F. V.; BOLDRIN, P. K.; VARANDA, E. A.; FERNANDES DE SOUZA, S.; SANO, P. T.; VILEGAS, W.; CAMPANER DOS SANTOS, L. Characterization of flavonoids and naphthopyranones in methanol extracts of P*aepalanthus chiquitensis* Herzog by HPLC-ESI-IT-MSn and their mutagenic activity. **Molecules**, v. 18, n. 1, p. 244–262, 2012.

ZORZI, G. K.; CAREGNATO, F.; MOREIRA, J. C. F.; TEIXEIRA, H. F.; CARVALHO, E. L. S. Antioxidant Effect of Nanoemulsions Containing Extract of *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C.—Asteraceae. **AAPS PharmSciTech**, v. 17, n. 4, p. 844–850, 2016.

9. ANEXOS

Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 48/2015
Interessado: MATHEUS APARECIDO DOS SANTOS RAMOS
Orientadora: Profa. Dra. Taís Maria Bauad
Projeto: *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland: prospecção químico-biológica do extrato metanólico de escapos no tratamento da candidíase vulvovaginal.

Parecer nº 90/2015 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, reunida em 16 de setembro de 2015, considerou que o protocolo para uso de animais na pesquisa: "Syngonanthus nitens (Bong.) Ruhland: prospecção químico-biológica do extrato metanólico de escapos no tratamento da candidíase vulvovaginal", apresentado pelo Pós-graduando MATHEUS APARECIDO DOS SANTOS RAMOS, sob orientação da Professora Doutora Taís Maria Bauad, do Departamento de Ciências Biológicas desta Faculdade, está estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.
O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em JANEIRO de 2017 em formulário para este fim.

Araraquara, 21 de setembro de 2015.

Prof. Dr. CARLOS CÉSAR CRESTANI
Coordenador da CEUA

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

Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 48/2015

Interessado: Matheus Aparecido dos Santos Ramos

Orientadora: Profa. Dra. Thais Maria Bauab

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

Parecer nº 12/2017 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, reunida em 29 de março de 2017, analisou o relatório final do protocolo para uso de animais na pesquisa: "Syngonanthus nitens (Bong.) Ruhland: prospecção químico-biológica do extrato metanólico de escapos no tratamento da candidíase vulvovaginal", apresentado pelo pós-graduando Matheus Aparecido dos Santos Ramos, sob orientação da Professora Doutora Thais Maria Bauab, do Departamento de Ciências Biológicas desta Faculdade, e considerou o referido relatório estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua aprovação.

Araraquara, 03 de abril de 2017.

Prof. Dr. CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA