

RESSALVA

Atendendo solicitação do (a) autor
(a), o texto completo desta tese será
disponibilizado a partir de

26/03/2020



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

ALINE DA GRAÇA SAMPAIO

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

2019

ALINE DA GRAÇA SAMPAIO

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

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

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

Orientadora: Profa. Tit. Cristiane Yumi Koga-Ito

Coorientadora: Prof. Dra. Aline Vidal Lacerda Gontijo

São José dos Campos

2019

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

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

Sampaio, Aline da Graça

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

98 f. : il.

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

Orientadora: Cristiane Yumi Koga-ito

Coorientadora: Aline Vidal Lacerda Gontijo

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

BANCA EXAMINADORA

Profa. Tit. Cristiane Yumi Koga Ito (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Faculdade de Saúde e Biociências

Campus de Paraná

Profa. Dra. Aline Chiodi Borges

Instituto Taubaté de Ensino Superior

Faculdade de Farmácia de Taubaté

Campus de Taubaté

São José dos Campos, 28 de março de 2019.

DEDICATÓRIA

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

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

As minhas irmãs, pela torcida e incentivo.

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

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

AGRADECIMENTOS

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

À CAPES pela concessão inicial da bolsa de Mestrado.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SUMÁRIO

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

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

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

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

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

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

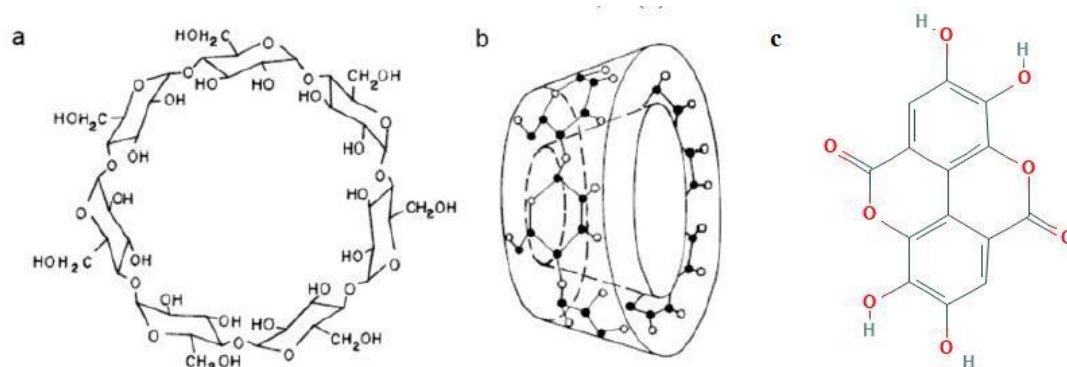
A limitação do ácido elágico é sua baixa solubilidade em água, sendo moderadamente solúvel em álcool. (Bala et al., 2006b; Lourenção Brighenti et al., 2017).

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

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

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

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



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

5 CONCLUSÃO

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

REFERÊNCIAS*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

11435107.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

