



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



**Avaliação *in vitro* do potencial antifúngico dos extratos de *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. (Asteraceae) e dos metabolitos secundários encapsulados em sistemas de liberação para tratamento de dermatofitose**

**MARÍA ANGÉLICA MERA CÓRDOBA**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro**

**Araraquara-SP**

**2022**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



**Avaliação *in vitro* do potencial antifúngico dos extratos de *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. (Asteraceae) e dos metabolitos secundários encapsulados em sistemas de liberação para tratamento de dermatofitose**

**MARÍA ANGÉLICA MERA CÓRDOBA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Rosemeire Cristina

Linhari Rodrigues Pietro

Araraquara-SP

2022



## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, pois tudo o que tenho conseguido tem sido pela bondade Dele.

Ao apoio de todos os meus familiares, principalmente de minha querida mãe Yaneth e minha irmã Jenny, obrigada pelo amor e compreensão que sempre me ofereceram à distância, tudo o que eu faço é por vocês.

Ao meu querido Charles, por seus conselhos, amor e a companhia nesta etapa da minha vida.

A minha orientadora Profa. Rosemeire Pietro, pela motivação, a paciência e por sempre compartilhar seu conhecimento. Agradeço a oportunidade concedida.

Aos professores, Prof. Dr. André Gonzaga, Profa. Dra. Ana Marisa, e Profa. Dra. Ana Melero pelas discussões e sugestões pertinentes para o desenvolvimento desse trabalho, além de compartilhamento de conhecimento e materiais.

As minhas melhores amigas Alexandra e Isabela, pela companhia, companheirismo durante esta etapa, amo vocês.

A todos alunos do Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica da FCFAr.

Ao Laboratório de Tecnologia Farmacêutica e Parasitologia da Universidade de Valencia

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro

## Lista de Figuras

- Figura 1.** Árvore filogenética dos dermatófitos. Fonte: Figura do próprio autor .... 28
- Figura 2.** (A) *Achyrocline satureioides* (B) Flores e folhas *A. satureioides*. Fonte: [http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open\\_sp.php?img=15004](http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=15004) ..... 41
- Figura 3.** Camadas de pele com infecções fúngicas. Fonte: Figura do próprio autor ..... 44
- Figura 4.** Representação esquemática do estrato córneo e os mecanismos de penetração de diferentes sistemas carregadores de fármacos. Fonte: Figura do próprio autor ..... 45
- Figura 5.** Esquema ilustrativo diferenciando os tipos de micropartículas (A) Microesferas (matriz polimérica) e (B) Microcápsulas (Cápsulas com parede polimérica e cavidade oca ou aquosa). Fonte: Figura do próprio autor ..... 46
- Figura 6.** Esquema da placa para determinação da CIM ..... 56
- Figura 7.** Reação de redução da resazurina a resorufina e diidroresorufina  
Fonte:(O'BRIEN et al., 2000). ..... 56
- Figura 8.** Percentual de células HaCat viáveis tratadas com os extratos etanólicos de folhas e flores *A. satureioides* após 24h de tratamento (n=4). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. CN: Controle negativo (células sem tratamento), CP: Controle positivo (Células tratadas com DMSO 50 %). Método estatístico utilizado ANOVA two-way com post hoc Tukey. .... 75
- Figura 9.** Percentual de células A549 viáveis tratadas com os extratos etanólicos de folhas e flores de *A. satureioides* após 24h de tratamento (n=4). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. CN: Controle

- negativo (células sem tratamento), CP: Controle positivo (Células tratadas com DMSO 50%). Método estatístico utilizado ANOVA two-way ..... 77
- Figura 10.** Percentual de células HepG2 viáveis tratadas com os extratos etanólicos de folhas e flores de *A. saturoioides* após 24h de tratamento (n=4). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. CN: Controle negativo (células sem tratamento), CP: Controle positivo (Células tratadas com DMSO 50%). Método estatístico utilizado ANOVA two-way com post hoc Tukey..... 78
- Figura 11.** Estabilização do radical DPPH<sup>\*</sup> por um antioxidante (RUFINO et al., 2007)..... 79
- Figura 12.** Curva da porcentagem de Inibição (%) do radical DPPH<sup>\*</sup>. (a) Extrato de folhas (b) Flores..... 80
- Figura 13.** Estabilização do radical ABTS<sup>\*\*</sup> por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio ..... 81
- Figura 14.** Curva da porcentagem de Inibição (%) do cátion radical ABTS<sup>+</sup>. (a) Extrato de folhas (b) Flores..... 82
- Figura 15.** Espectros no UV de ergosterol. Acima, ergosterol puro, adquirido comercialmente, em diferentes concentrações. Tr1, Mc, Tr1 FOC e Tm: Azul escuro, controle sem tratamento; em laranja, tratamento com Extrato de folhas; em roxo, tratamento com extrato de flores; verde com tratamento com fluconazol e azul claro tratamento com cetoconazol ..... 85
- Figura 16.** Ação do Sorbitol nas células. Fonte: Figura própria do autor..... 90
- Figura 17.** Microscopia de imunofluorescência da cepa *T. mentagrophytes* coradas com Calcofluor White (A-D) e com Vermelho do Nilo (E-H). (A e E)

culturas tratadas com extrato de folha (312,5 µg/mL); (B e F) culturas tratadas com extrato de flor (312,5 µg/mL); (C e G) culturas tratadas com fluconazol (16 µg/mL); (D e H) culturas controle a escala de 10 µm..... 92

**Figura 18.** Microscopia de imunofluorescência da cepa *M. canis* coradas com Calcofluor White (A-D) e com Vermelho do Nilo (E-H). (A e E) culturas tratadas com extrato de folha (156,25µg/mL); (B e F) culturas tratadas com extrato de flor (156,25 µg/mL); (C e G) culturas tratadas com fluconazol (8 µg/mL); (D e H) culturas controle a escala de 10 µm. .... 93

**Figura 19.** Microscopia de imunofluorescência da cepa *T. rubrum* coradas com Calcofluor White (A-D). (A) culturas tratadas com extrato de folha (156,25µg/mL); (B) culturas tratadas com extrato de flor (312,5 µg/mL); (C) culturas tratadas com fluconazol (2 µg/mL); (D) culturas controle a escala de 10 µm. 95

**Figura 20.** Cromatograma do extrato de flores de *A. saturoioides* obtido pelo detector de arranjo de diodos modo gradiente linear de 30% de MeCN (ácido fórmico 0,1%) (v/v) para 90% de MeCN (ácido fórmico 0,1%) (v/v) em 30 min, vazão 0,25 mL/min, volume de injeção 5 µL..... 96

**Figura 21.** Espectro de massas ESI<sup>-</sup> do 3,5-di-O-cafeoilquínico, m/z 515 [M - H]<sup>-</sup>.  
..... 97

**Figura 22.** Espectro de massas ESI<sup>-</sup> do ácido cis/trans 5-O-cafeoilquinico, m/z 353 [M -H]<sup>-</sup>. .... 98

**Figura 23.** Espectro de massas ESI<sup>-</sup> do trans-4-O-cafeoilquinico, m/z 353 [M - H]<sup>-</sup>.  
..... 98

**Figura 24.** Espectro de massas ESI<sup>-</sup> do kaempferol, m/z 285 [M - H]<sup>-</sup>..... 99

**Figura 25.** Espectro de massas ESI<sup>-</sup> do luteolina, m/z 285 [M - H]<sup>-</sup>. .... 99

<b>Figura 26.</b> Espectro de massas ESI- da quercetina, $m/z$ 301 [M - H]-.....	100
<b>Figura 27.</b> Fragmentação Quercetina MS/MS $m/z$ : 301 .....	100
<b>Figura 28.</b> Espectro de massas ESI- da 3-O-metil-quercetina, $m/z$ 315 [M - H].	101
<b>Figura 29.</b> Fragmentação 3-O-metil-quercetina MS/MS $m/z$ :315 .....	102
<b>Figura 30.</b> Cromatograma do extrato de folhas de <i>A. saturoioides</i> obtido pelo detector de arranjo de diodos Modo gradiente linear de 30% de MeCN (ácido fórmico 0,1%) (v/v) para 90% de MeCN (ácido fórmico 0,1%) (v/v) em 30 min, vazão 0,25 mL/min, volume de injeção 5 $\mu$ L.....	104
<b>Figura 31.</b> Fotomicrografias A. Quitosana/Soluplus®/ácido 5-O- cafeoilquínico. B. Quitosana/Soluplus®/quercetina. C. Quitosana/ Tween® 80/ácido 5-O- cafeoilquínico. D. Quitosana/ Tween® 80/quercetina. ....	108
<b>Figura 32.</b> Penetração de QR no estrato córneo após 2h e 6h de aplicação das formulações QR1, QR2 e QR3 .....	119
<b>Figura 33.</b> Penetração de AC no estrato córneo após 2h e 6h de aplicação das formulações AC1, AC2 e AC3. ....	120

### Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Classificação geral dos dermatófitos em base a parâmetros clínicos e ecológicos.....	26
<b>Tabela 2.</b> Metabólitos derivados de plantas com propriedades antifúngicas .....	36
<b>Tabela 3.</b> Linhagens fúngicas .....	54
<b>Tabela 4.</b> Quantidades usadas no preparo de soluções para a determinação de atividade antioxidante pela liberação do radical DPPH*.....	57
<b>Tabela 5.</b> Quantidades usadas no preparo de soluções para a determinação de atividade antioxidante pela liberação do cátion radical ABTS** .....	58
<b>Tabela 6.</b> Concentração das amostras vegetais e antifúngicos para o ensaio de quantificação de ergosterol.....	60
<b>Tabela 7.</b> Parâmetros avaliados na validação 1 e 2 para a quantificação de QR e AC por HPLC .....	65
<b>Tabela 8.</b> Condições cromatográficas utilizadas nas validações dos métodos.....	66
<b>Tabela 9.</b> Agrupação de fitas para cada strip.....	70
<b>Tabela 10.</b> Valores de CIM e CFM das amostras vegetais e os fármacos antifúngicos.....	72
<b>Tabela 11.</b> Resultados da redução dos radicais DPPH* pelos extratos de <i>A. satureioides</i> e padrões.....	80
<b>Tabela 12.</b> Resultados da redução do cátion radical ABTS** pelos extratos de <i>A. satureioides</i> e padrões.....	82
<b>Tabela 13.</b> Média do conteúdo de ergosterol em relação ao peso seco da célula, em parênteses são apresentadas as variações de porcentagens de ergosterol. ....	83

<b>Tabela 14.</b> Valores de CIM dos extratos de <i>A. saturoioides</i> e os antifúngicos com adição de ergosterol exógeno.....	87
<b>Tabela 15.</b> Valores de CIM dos extratos de <i>A. saturoioides</i> e os antifúngicos com adição de sorbitol.....	88
<b>Tabela 16.</b> Identificação dos principais compostos no extrato de flores de <i>A. saturoioides</i> por tempo de retenção, comprimentos de onda do espectro UV e íons e íons negativos obtidos por UPLC-QTOF-MS/MS.....	103
<b>Tabela 17.</b> Identificação dos principais compostos no extrato de folhas de <i>A. saturoioides</i> por tempo de retenção, comprimentos de onda do espectro UV e íons e íons negativos obtidos por UPLC-QTOF-MS/MS.....	105
<b>Tabela 18.</b> Valores de CIM e CFM dos ativos QR e AC e as formulações .....	110
<b>Tabela 19.</b> Exatidão e precisão do método analítico com QR F (n = 3).....	112
<b>Tabela 20.</b> Exatidão e precisão do método analítico com AC F (n = 3). .....	112
<b>Tabela 21.</b> Valores das áreas referentes ao pico de QR no estudo da repetibilidade e precisão intermediária do método .....	114
<b>Tabela 22.</b> Valores das áreas referentes ao pico de AC no estudo da repetibilidade e precisão intermediária do método.....	114
<b>Tabela 23.</b> Avaliação da exatidão do método analítico de quantificação de QR e AC por HPLC/UV-vis.....	115
<b>Tabela 24.</b> Valores de robustez obtidos pelo método HPLC-UV-vis para análise de QR .....	116
<b>Tabela 25.</b> Valores de robustez obtidos pelo método HPLC-UV-vis para análise de AC.....	117

<b>Tabela 26.</b> Determinação dos limites de detecção e de quantificação de quercetina e ácido 5-O- cafeoilquínico por HPLC-UV-vis. ....	117
<b>Tabela 27.</b> Porcentagem de ácido 5-O- cafeoilquínico presentes no extrato de folhas e nas formulações .....	118
<b>Tabela 28.</b> Porcentagem de quercetina presentes no extrato de flores e nas formulações .....	118

### Lista de Abreviaturas

**A549:** Linhagem de células humanas do epitélio alveolar basal

**ABTS:** [2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico]

**AC:** Ácido 5-O- cafeoilquínico

**ANVISA:** Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**BDA:** Ágar batata dextrose

**CIM:** Concentração Inibitória Mínima

**CE<sub>50</sub>:** Concentração Efetiva

**CFM:** Concentração Fungicida Mínima

**CLSI:** Clinical and Laboratory Standards Institute

**%CV:** Porcentagem de coeficiente de variação

**CW:** Calcofluor White

**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**DPPH:** 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

**DPR:** Desvio Padrão Relativo

**EDTA:** Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

**EPR:** Erro padrão relativo

**EtOH:** Etanol

**HaCat:** Linhagem imortalizada de queratinócitos

**HepG2:** Linhagem de células de carcinoma hepático

**HPLC/UV:** High-Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet

**ICH:** Conferência Internacional sobre Harmonização

**LD:** Limite de detecção

**LQ:** Limite de quantificação

**Mc:** *Microsporium canis*

**MEV:** Microscopia Eletrônica de Varredura

**MOPS:** Ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico

**MPs:** Micropartículas

**OMS:** Organização Mundial da Saúde

**PBS:** Phosphate Buffered Saline

**P3HB:** Poli-3-hidroxi-butirato

**PTFE:** Politetrafluoretileno

**PLGA:** Poli(ácido láctico-glicólico)

**RDC:** Resolução da Diretoria Colegiada

**QR:** Quercetina

**SC:** Stratum corneum

**TEB:** Tebuconazol

**t<sub>R</sub>:** Tempo de retenção

**Tr1:** *Trichophyton rubrum*

**Tr1 FOC:** *Trichophyton rubrum*, cepa cedida pela Fundação Oswaldo Cruz

**Tm:** *Trichophyton mentagrophytes*

**UPLC-QTOF-MS/MS:** *Ultra-High Performance Liquid Chromatography Coupled to Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry* (Cromatografia Líquida de Ultra Performance Acoplada a Espectrometria de Massas com Analisador do Tipo Quadrupolo - Tempo De Voo)

**VN:** Vermelho do Nilo

## RESUMO

A planta *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C (Compositae), vem sendo estudada por vários países, devido às evidências sobre suas diferentes propriedades biológicas. No presente estudo foi avaliado o potencial antifúngico dos extratos etanólicos de folhas e flores frente a diferentes cepas dermatofíticas. Ambos os extratos foram capazes de atuar como agentes fungicidas e fungistáticos. O estudo do mecanismo de ação dos extratos, demonstrou que a atividade do extrato de flores provavelmente esteja associada à membrana celular, devido a sua capacidade de inibir e complexar-se a ergosterol. Estes resultados foram concordantes com as imagens obtidas por microscopia confocal, onde foi observada a diminuição de lipídeos neutros nas culturas tratadas com Vermelho do Nilo. A ação do extrato de folhas possivelmente está relacionada frente à parede celular devido ao aumento dos valores das Concentrações Inibitórias Mínimas em presença do estabilizante sorbitol. Através dos ensaios de inibição do radical DPPH<sup>•</sup> e o cátion radical ABTS<sup>•+</sup>, foi demonstrado que o extrato de flores possui melhor potencial antioxidante que o extrato de folhas, devido a diferença encontrada nos valores de concentração efetiva. Os ensaios de citotoxicidade *in vitro*, mostraram que ambos os extratos diminuíram a viabilidade das células HaCat. Adicionalmente, foi demonstrado que o extrato de folhas apresentou citotoxicidade frente às células HepG2 enquanto frente às células A549 não foram evidenciadas alterações na porcentagem da viabilidade celular. Foram analisados também os perfis químicos dos extratos por UPLC-QTOF-MS/MS. Os cromatogramas e espectros revelaram a presença de flavonoides e derivados de fenilpropanoides e ácido quínico. Os compostos majoritários encontrados foram 3-O-metil-quercetina e a quercetina no extrato de flores e o ácido 5-O- cafeoilquínico no extrato de folhas. Foram incorporados quercetina e o ácido 5-O- cafeoilquínico em micropartículas de quitosana e Tween® 80 e em micelas poliméricas sendo comparado o potencial antimicrobiano destas formulações com a atividade antimicrobiana determinada nos extratos brutos. Os resultados mostraram que todos os sistemas apresentaram melhor potencial antifúngico que os extratos, principalmente aqueles onde foi incorporado a quercetina. Através dos ensaios de

tape stripping foi demonstrado que as formulações com a quercetina encapsulada, apresentaram melhor capacidade de penetração no estrato córneo que as formulações com ácido 5-O- cafeoilquínico após 2 e 6 horas de tratamento. Extratos de folhas e flores da *A. satureioides* são agentes fungicidas e fungistáticos frente a diferentes cepas de dermatófitos e a incorporação em micropartículas poliméricas melhorou a atividade antifúngica.

**Palavras-chave:** *Achyrocline satureioides*, atividade antifúngica, incorporação de ativos em formulações, micropartículas, micelas poliméricas, quercetina, ácido 5-O- cafeoilquínico.

## ABSTRACT

The plant *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C (Compositae), has been studied by several countries, due to evidence about its different biological properties. In the present study, the antifungal potential of ethanolic extracts of leaves and flowers against different dermatophytic strains was evaluated. Both extracts were able to act as fungicidal and fungistatic agents. The study of the mechanism of action of the extracts showed that the activity of the flower extract is probably associated with the cell membrane, due to its ability to inhibit and complex with ergosterol. These results were in agreement with the images obtained by confocal microscopy, where a decrease in neutral lipids was observed in the cultures treated with Nile Red. The action of the leaf extract is possibly related to the cell wall due to the increase of the Minimum Inhibitory Concentration values in the presence of the sorbitol stabilizer. Through the DPPH radical and ABTS<sup>•+</sup> radical cation inhibition assays, it was demonstrated that the flower extract has a better antioxidant potential than the leaf extract, due to the difference found in the effective concentration values. The in vitro cytotoxicity assays showed that both extracts decreased the viability of HaCat cells. Additionally, it was demonstrated that the leaf extract showed cytotoxicity against HepG2 cells while against A549 cells, no changes were observed in the percentage of cell viability. The chemical profiles of the extracts were also analyzed by UPLC-QTOF-MS/MS. The chromatograms and spectra revealed the presence of flavonoids and phenylpropanoid derivatives and quinic acid. The majority compounds found were 3-O-methyl-quercetin and quercetin in the flower extract and 5-O-caffeoylquinic acid in the leaf extract. Quercetin and 5-O-caffeoylquinic acid were incorporated into chitosan and Tween® 80 microparticles and into polymeric micelles, comparing the antimicrobial potential of these formulations with the antimicrobial activity determined in the crude extracts. The results showed that all the systems presented better antifungal potential than the extracts, especially those where quercetin was incorporated. Through tape stripping assays it was demonstrated that the formulations with encapsulated quercetin showed better penetration capacity in the stratum corneum than the formulations with 5-O-caffeoylquinic acid

after 2 and 6 hours of treatment. Extracts from leaves and flowers of *A. saturoioides* are fungicidal and fungistatic agents against different strains of dermatophytes and incorporation into polymeric microparticles improved the antifungal activity.

**Keywords:** *Achyrocline saturoioides*, antifungal activity, incorporation of actives in formulations, microparticles, polymeric micelles, quercetin, 5-O-caffeoylquinic acid.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	22
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	25
2.1. Infecções fúngicas superficiais causadas por dermatófitos .....	25
2.2.1 Classificação taxonômica dos dermatófitos .....	26
2.2.2 Gêneros .....	29
2.2.3 Espécies mais comuns associadas a infecções por dermatofitose.....	31
2.3 Tratamento das dermatofitoses: Antifúngicos tópicos e sistêmicos .....	33
2.4 Uso de plantas para o tratamento de infecções fúngicas superficiais no Brasil .....	38
2.5 Plantas da família Asteraceae .....	39
2.5.1 <i>Achyrocline satureioides</i> .....	40
2.6 Sistemas de liberação de fármacos antifúngicos para uso tópico.....	42
2.6.1 Micropartículas.....	45
2.6.2 Micelas.....	48
3. OBJETIVOS.....	50
3.1 Objetivo geral.....	50
3.2 Objetivos específicos .....	50
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
4.1 Solventes, reagentes e meios de cultura .....	51
4.2 Equipamentos .....	52
4.3 Material Vegetal .....	53
4.3.1 Obtenção dos extratos hidroetanólicos.....	53
4.4 Microrganismos e condições de cultivo.....	53

4.4.1 Preparação do inóculo .....	54
4.5 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e Fungicida Mínima (CFM) dos extratos de folhas e flores de <i>A. saturoioides</i> .....	55
4.6 Avaliação da Atividade antioxidante.....	57
4.6.1 Avaliação da atividade antioxidante pela captura do radical livre DPPH· .....	57
4.6.2 Avaliação da atividade antioxidante total pelo cátion radicalar ABTS <sup>+</sup> ..	58
4.7 Avaliação da Citotoxicidade “ <i>in vitro</i> ” .....	59
4.8 Avaliação do mecanismo de ação dos extratos de <i>A. saturoioides</i> frente os dermatófitos .....	59
4.8.1 Quantificação do Ergosterol.....	59
4.8.2 Ligação ao ergosterol exógeno.....	61
4.8.3 Efeito de proteção do sorbitol .....	61
4.8.4 Estudo da integridade da parede celular e da presença de lipídeos neutros nos dermatófitos por microscopia confocal .....	62
4.9 Preparação de Sistemas de liberação .....	63
4.9.1 Preparação de micropartículas de quercetina e ácido 5-O- cafeoilquínico por Spray-drying .....	63
4.9.2 Preparação de micelas poliméricas por hidratação de películas finas contendo quercetina e ácido 5-O- cafeoilquínico.....	64
4.9.3 Determinação da CIM e CFM das formulações .....	64
4.10 Identificação das substâncias por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas .....	64
4.11 Desenvolvimento e validação dos métodos analíticos para a quantificação de quercetina e ácido 5-O- cafeoilquínico nos extratos de folhas e flores e nos sistemas de liberação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	65
4.11.1 Condições Cromatográficas.....	66

	20
4.11.2 Preparo das soluções padrão .....	66
4.11.3 Desenvolvimento do método .....	67
4.11.4 Parâmetros de validação .....	67
4.12 Tape stripping.....	70
4.13 Análise estatística .....	71
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
5.1 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos de <i>A. saturoioides</i> .....	72
5.2 Avaliação da citotoxicidade “ <i>in vitro</i> ”.....	75
5.3. Avaliação da atividade antioxidante pela captura dos radicais livres DPPH <sup>•</sup> e ABTS <sup>•+</sup> .....	79
5.4 Investigação do mecanismo de inibição da biossíntese de ergosterol.....	83
5.5 Análise do efeito de complexação com ergosterol exógeno .....	86
5.6. Efeito protetor do sorbitol .....	88
5.7 Estudo da presença de lipídeos neutros e da integridade da parede celular nos dermatófitos por microscopia confocal .....	91
5.8 Análises do perfil químico dos extratos de folhas e flores de <i>A. saturoioides</i> por UPLC-QTOF-MS/MS .....	96
5.9 Obtenção das micropartículas por spray-drying.....	106
5.10 Caracterização das micropartículas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	107
5.11 Obtenção de micelas poliméricas por hidratação de película finas.....	108
5.12 Avaliação da atividade antimicrobiana o ácido 5-O- cafeoilquínico e a quercetina e as formulações incorporando estes ativos .....	109
5.13 Validação das metodologias analíticas para quantificação de quercetina e ácido 5-O- cafeoilquínico nos extratos brutos e nas formulações por HPLC/UV. .....	111

5.14. Estudos de penetração em pele humana: <i>Tape Stripping</i> .....	118
6. CONCLUSÕES .....	122
7. REFERÊNCIAS .....	124

## 1. INTRODUÇÃO

A dermatofitose é uma doença contagiosa causada por fungos dos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton Nannizzia*, *Lophophyton*, *Paraphyton* e *Arthroderma*. As espécies compreendidas nestes gêneros são conhecidas como dermatófitos e caracterizam-se por serem de tipo queratinofílico. Esses fungos geralmente localizam-se nas camadas mais superficiais da pele, porém quando acometem as regiões mais profundas, produzem inflamações severas (SYKES; OUTERBRIDGE, 2014). Cabe ressaltar que a maioria de dermatófitos reside no solo e estão envolvidos na decomposição; no entanto, alguns podem infectar aos seres humanos e animais (BAUMGARDNER, 2017).

As dermatofitoses são conhecidas também como tinhas ou tineas, epidermofitíases, onicomicoses dermatofíticas ou dermatofitoses subcutânea e profunda. Dependendo do local da infecção, a tineas classifica-se como *tinea corporis* que envolve os braços, tronco e pernas, *tinea capitis* (TC) que afeta o couro cabeludo, e *tinea pedis* os pés (FARAH; ASHMAN; CHALLACOMBE, 2000).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a dermatofitose é considerada uma doença grave principalmente em pacientes imunocomprometidos já que provoca infecções atípicas localmente agressivas, como a dermatite extensiva, abscessos subcutâneos ou doenças causadas por infecções bacterianas secundárias (AL HASAN et al., 2004; WOODFOLK, 2005).

Atualmente existem vários antifúngicos usados para o tratamento das dermatofitoses que levam na sua fórmula moléculas sintéticas como os derivados imidazólicos (miconazol, cetoconazol, econazol, oxiconazol e clotrimazol), derivados carbanílicos (tolnaftato e tolclato) ou alinaminas (terbinafina). A administração desses fármacos de forma tópica ou sistêmica tem diminuído relativamente a frequência das micoses em geral, no entanto, alguns deles apresentam certas desvantagens para serem usados clinicamente; entre elas, toxicidade, interações fármaco-fármaco, falta de eficácia fungicida, custo e a

aparição de cepas resistentes causadas pelo uso frequente de alguns deles (MORRIS; VILLMANN, 2006).

Esses aspectos mostram claramente a necessidade de encontrar novos agentes terapêuticos, que sejam mais eficazes e menos tóxicos para os indivíduos acometidos. Dessa forma, as plantas com potencial medicinal são consideradas instrumentos importantes da assistência farmacêutica. Segundo a OMS de 70% a 90% da população de países em desenvolvimento dependem das plantas como integrante principal no desenvolvimento da atenção primária à saúde (WHO, 1993, 2011).

O Brasil é o país com a maior diversidade biológica do mundo. De acordo com a Conservation International, 70% da flora do mundo e fauna são encontradas em dezessete países do mundo e ocupam apenas cerca de 10% da superfície da terra. O Brasil é o mais megadiverso desses dezessete, por apresentar a maior diversidade biológica terrestre (flora e fauna) (ABRANCHES, 2020).

Dentre as diversas plantas presentes no Brasil, destaca-se a planta *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. (Asteraceae) espécie pertencente à família Asteraceae nativa de América do Sul, conhecida popularmente como marcela ou macela (SABINI et al., 2012). Estudos tem atribuído diversas propriedades terapêuticas dessa planta. (DE SOUZA; BASSANI; SCHAPOVAL, 2007; HNATYSZYN et al., 2004; POLYDORO et al., 2004; RETTA et al., 2012; SABINI et al., 2012; SIMÕES et al., 1988), porém, ainda não tem se reportado estudos sobre seu potencial antifúngico frente a cepas dermatofíticas. Pesquisas de resgate etnográfico catalogam a *A. satureioides* como uma efetiva planta medicinal, onde o uso das inflorescências como infusos (chás) tem demonstrado efeitos antidiarreicos, antiespasmódicos, analgésico, antiinflamatórios e antimicrobianos (BOSCOLO; VALLE, 2008), também há vários estudos que tem confirmado sua atividade farmacológica (CALVO et al., 2006; CASERO et al., 2015; MOTA; CARVALHO; WIEST, 2011; VENDRUSCOLO; RATES; MENTZ, 2005). Zayachkivska e colaboradores (2005) relacionam estas propriedades a seu alto

conteúdo de flavonoides em suas folhas e partes áreas; como, a luteolina, a quercetina, a 3-O-metil-quercetina, a aquirobichalcona e a derivados de fenilpropanoides e o ácido quínico como o ácido 5-O- cafeoilquínico (CARINI et al., 2015; RETTA et al., 2012; ZAYACHKIVSKA et al., 2005). Pesquisas afirmam inclusive que a forma de extração destes princípios bioativos influenciam na atividade biológica(MOTA; CARVALHO; WIEST, 2011). Considerando o estudo com base no uso popular, as evidencias científicas e as investigações previas realizadas no grupo de pesquisa Biotecfar da UNESP sobre a *A. saturoioides*, foi escolhida esta planta como objetivo de estudo para investigar sobre seu potencial antifungico.

Como foi mencionado anteriormente esta planta é rica em metabólitos, porém, como é comum com outros compostos polifenólicos estes apresentam baixa solubilidade em meios aquosos, o que dificulta sua administração intradérmica, aspecto importante a ser considerado no desenvolvimento de um tratamento para dermatofitose. A baixa absorção e penetração destas substâncias na pele (HATAHET et al., 2016; SAIJA, 2003; ZHENG et al., 2005) diminuem a eficácia dos ativos e por tanto seu potencial. Assim o objetivo desta pesquisa foi investigar a atividade antifúngica de *A. saturoioides* bem como também foram propostas formulações farmacêuticas (micropartículas e micelas) a fim de encapsular alguns ingredientes ativos presentes na *A. saturoioides* e avaliar se há melhora na atividade biológica evidenciada.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Infecções fúngicas superficiais causadas por dermatófitos

A dermatofitose é considerada uma doença de importância global provocada por fungos queratinofílicos patogênicos chamados dermatófitos, tanto em animais quanto em humanos. Anteriormente os dermatófitos patogênicos se classificavam em três gêneros, *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*. Entretanto, com o avanço das técnicas de diagnóstico, foram descobertos mais quatro gêneros: *Arthroderma*, *Lophophyton*, *Nannizzia*, e o *Paraphyton* (BEGUM et al., 2020).

Em termos globais, aproximadamente 20 a 25% da população é afetada por micose superficial com preponderância da dermatofitose (HAVLICKOVA; CZAIKA; FRIEDRICH, 2008; KUMAR et al., 2021). Nas últimas duas décadas, houve um aumento dramático na incidência da dermatofitose em humanos como resultado de problemas socioeconômicos, viagens internacionais e contato com animais, particularmente animais de estimação. A idade crescente e o uso de imunossupressores são os fatores predisponentes para o aumento de morbidade induzida pela dermatofitose em humanos (KIZNY GORDON et al., 2016).

A dermatofitose é considerada uma doença crônica, e seu controle requer de uma correta identificação para poder estabelecer uma terapia antifúngica específica e dessa forma conseguir a prevenção de maior disseminação para o ser humano e/ou os animais (KANBE, 2008; REZAEI-MATEHKOLAEI et al., 2013).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as dermatofitoses são infecções naturalmente transmissíveis entre animais e humanos, sendo responsáveis por mais de 60% das doenças infecciosas em humanos (WHO, 2018). Alguns estudos relatam que as espécies de *Trichophyton* são os principais agentes causadores da dermatofitose com uma taxa de prevalência de 70-90% para a onicomicose e 53-86% para o resto das infecções por tinea (BALAKUMAR et al., 2012; GARG et al., 2004). Destes, o *Trichophyton rubrum* é o agente etiológico chave seguido pelo complexo *T. mentagrophytes*, *Microsporum canis* e *M. gypseum* (PEERAPUR et al., 2004; SINGAL et al., 2001, 2015).

As dermatofitoses podem ser classificadas de acordo com o lugar anatômico onde se apresenta a infecção, desta forma se denominam *tinea capitis* (dermatófitos no couro cabeludo e pelo de cabeça), *tinea unguium* (unhas), *tinea pedis* (pés), etc (HAYETTE; SACHELI, 2015) e a sintomatologia depende do lugar infectado e do dermatófito envolvido.

De acordo com o habitat natural, os dermatófitos podem ser classificados em três grupos ecológicos: *geofílicos*, compreendem espécies que se encontram no solo atuando como saprófitos e se nutrem da queratina existente (pelos, escamas e penas), afetando tanto ao ser humano como animais. Por outro lado, estão os *zoofílicos* que são os responsáveis por infectar animais e estes podem infectar o ser humano. Finalmente estão os *antropofílicos* que compreendem as espécies que infectam unicamente o ser humano e são transmitidas pelo contato direto ou indireto (BARBOSA BRASILEIRO et al., 2020). A Tabela 1 apresenta a classificação dos dermatófitos de acordo com os parâmetros clínicos e ecológicos.

**Tabela 1.** Classificação geral dos dermatófitos em base a parâmetros clínicos e ecológicos

<b>Características</b>	<b>Geofílicos</b>	<b>Zoofílicos</b>	<b>Antropofílicos</b>
<b>Filogênese</b>	Ancestral	Moderado	Derivado
<b>Sexualidade</b>	Vigoroso	“mating” moderado	Clonal
<b>Infeção</b>	Altamente inflamatória	Moderadamente inflamatório	Não inflamatório
<b>Transmissão</b>	Via meio ambiente	Duplo ciclo de vida	Via hospedeiro
<b>Resolução</b>	Resolução rápida	Epidemias resolvidas e autolimitadas	Crônica

(DE HOOG et al., 2017a)

### 2.2.1 Classificação taxonômica dos dermatófitos

Emmons e colaboradores, classificaram os dermatófitos em três gêneros: *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epydermophyton*. Esta classificação foi baseada nas características dos conídios, células que são reproduzidas mediante uma fase assexual (EMMONS, 1934). No entanto, a partir de 1960, pesquisas revelaram

que os dermatófitos também conseguem se reproduzir sexualmente mediante ascósporos (GRIFFIN, 1960; NANNIZZI, 1961), desta forma foram classificados como Ascomicetes dentro da família *Gymnoascaceae*. Porém, a taxonomia dos dermatófitos mudou no começo de 2017 (DE HOOG et al., 2017a). A árvore filogenética apresentada na Figura 1, com base em dados moleculares, mostra a atual denominação sobre a nomenclatura da família *Arthrodermataceae*. Anteriormente, a família de *Arthrodermataceae*, compreendia os fungos dermatófitos incluindo três gêneros anamorfos (*Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*) e um teleomorfo (*Arthroderma*).

Em 2011, esta nomenclatura de fungos foi abolida, principalmente porque a base da taxonomia se afastou usando características morfológicas em direção a características moleculares e dados filogenéticos. Nesta base, o gênero teleomorfo em dermatófitos foi abolido e quatro gêneros adicionais (*Nannizzia*, *Lophophyton*, *Paraphyton* e *Arthroderma*) foram introduzidos para contabilizar os fungos *Microsporum geofílico* e *Trichophyton* spp, considerando as diretrizes do código botânico. Na classificação da árvore filogenética multilocus foram considerados alguns parâmetros clínicos, razão pela qual os fungos antropofílicos e zoofílicos foram mantidos nos gêneros *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton* (DE HOOG et al., 2017a).

No início do século XXI, 50 das espécies classificadas no gênero *Trichophyton* (antropofílicos e zoofílicos) foram reduzidas a 19 e em 2017 a 3, devido ao desaparecimento do gênero teleomorfo. Desde esse momento as correções afetaram a classificação, entre essas modificações as cepas antropofílicas e zoofílicas de *Trichophyton interdigitale* foram separadas, ou seja, as linhagens zoofílicas receberam o nome da própria espécie como por exemplo *Trichophyton mentagrophytes* enquanto as linhagens antropofílicas de *T. interdigitale* (DE HOOG et al., 2017b; GRÄSER; SAUNTE, 2020).

Por outro lado as espécies *Trichophyton* sp. de *Arthroderma benhamiae*, isoladas de porcos da Guiné, foram separadas do gênero *T. rubrum* e foram classificadas dentro dos gêneros *T. benhamiae* e *T. soudanense*. As novas

combinações de nomes foram também acrescentadas, que em sua maioria tratassem de espécies geofílicas.

Devido à introdução dos novos nomes de gênero, a espécie *Microsporum gypseum* foi renomeada como *Nannizzia gypsea* (BAERT et al., 2019; GRÄSER; SAUNTE, 2020).

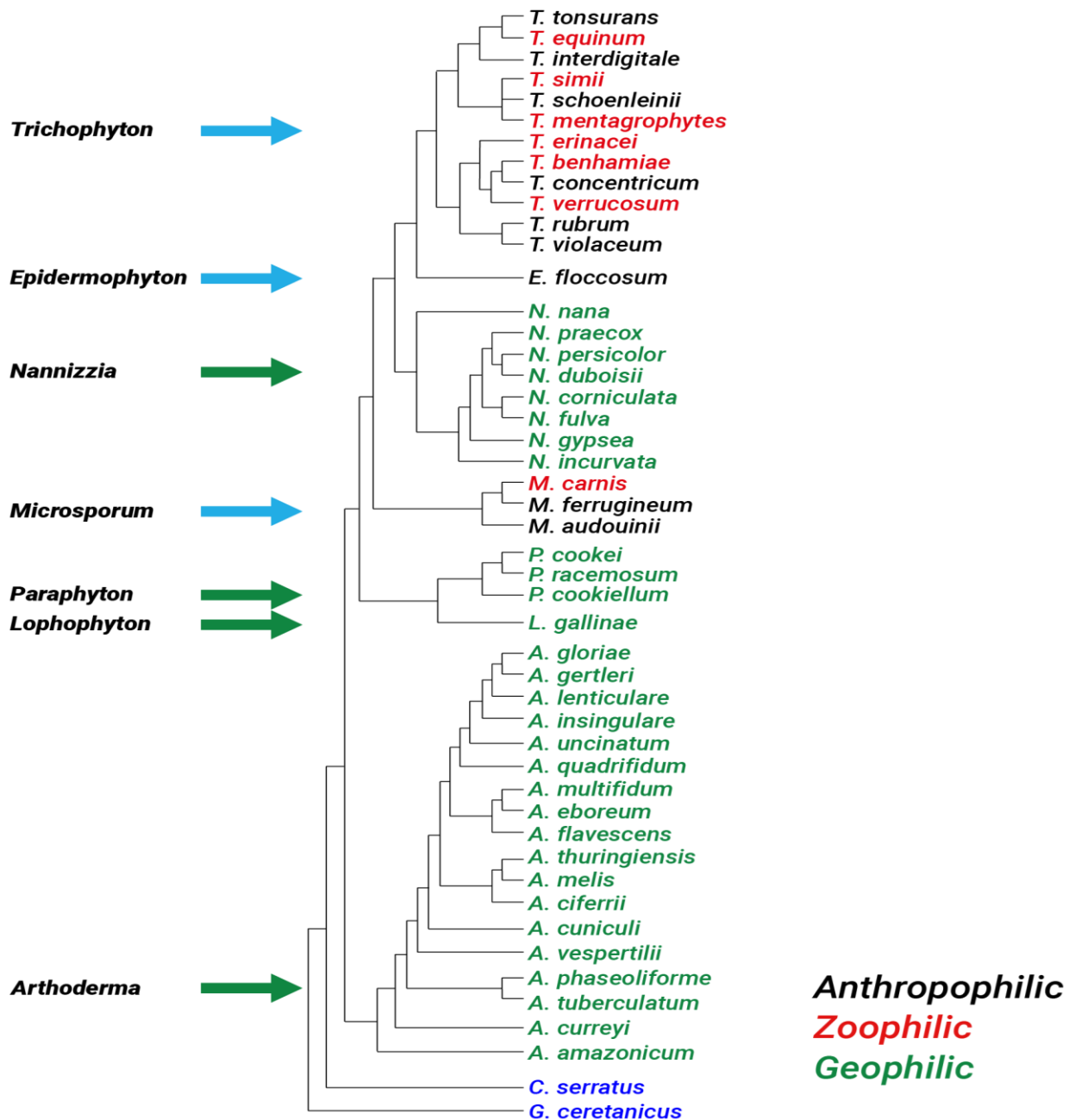


Figura 1. Árvore filogenética dos dermatófitos. Fonte: Figura do próprio autor

## **2.2.2 Gêneros**

### **2.2.2.1 *Arthroderma***

Estudos tem revelado que as colônias de *Arthroderma* estão compostas por abundantes células microconídios em abundância. A estes microconídios sésseis e piriformes ligeiramente clavulados são aderidas hifas indiferenciadas com uma base ligeiramente mais estreita do que sua circunferência distal. Os microconídios apresentam um tamanho de cerca de 2 µm x 4-6 µm (BRASCH et al., 2019).

### **2.2.2.2 *Epidermophyton***

As colônias são de crescimento lento, ao princípio granulosas, depois se tornam pulverulentos, de cor amarelo intenso ou marrom, a superfície poder ser lisa ou rugosa com centro cerebriforme. Não possuem microconídios, no entanto apresentam macroconídios, claviformes, de parede lisa dispostos em grupo. Este gênero inclui duas espécies reconhecidas e unicamente a *Epidermophyton floccosum* (Figura 3) é patógeno humano (DAVEL, 2009; KWON-CHUNG, 1992).

### **2.2.2.3 *Microsporum***

As colônias do gênero *Microsporum* se caracterizam por apresentar um crescimento rápido, planas e algodonosas podendo se tornar em granulosas. As cores no anverso e reverso dependem muito da espécie, possuem bastante macronídios, fusiformes de parede grossa ou fina, lisa ou rugosa. Os microconídios são claviformes e crescem geralmente sobre pequenos pedúnculos ao longo da hifa. Dentro das espécies associadas à infecção em humanos estão o *M. canis* e o *M. gypseum* (DAVEL, 2009; KWON-CHUNG, 1992).

### **2.2.2.4 *Nannizzia***

As colônias do gênero *Nannizzia* se caracterizam por estar cobertas por hifas peridiais espiraladas e torcidas, compostas de células ossiformes e esféricas, evanescentes, contendo ascósporos unicelulares e lenticulares. O estado assexual é caracterizado por macroconídios multissepto, de paredes finas a espessas e ornamentadas (DUKIK et al., 2019). Através de experiências sistemáticas de acasalamento em meios queratinofílicos, Stockdale descobriu os

estados sexuais em fungos anteriormente conhecidos como *Microsporum fulvum* e *M. gypseum* (STOCKDALE, 1963). De acordo com as regras nomenclaturais vigentes, estes receberam os de nomes *Nannizzia fulva* e *N. gypsea*. A maioria das espécies que foram classificadas no gênero *Nannizzia* foram descritas com dupla nomenclatura, após encontrar a forma sexual heterotálica. Dentro das espécies compreendidas neste gênero a espécie *Nannizzia nana* um dermatófito zoofílico é a espécie principal deste gênero pois é o responsável de causar doenças em porcos, javalis e, excepcionalmente, humanos, causando tinea capitis, tinea corporis e onicomicose (BONIFAZ et al., 2019).

#### **2.2.2.5 Paraphyton**

As colônias em sua maioria são granulares, acastanhadas, com uma cor marrom ao inverso. Os macroconídios e microconídios, estão dispostos em sistemas hifas organizadas de forma ortotrópicamente. Os macroconídios, são multicelulares, de paredes grossas e rugosas, (sub) hialina, clavícula ou em forma de charuto. Por outro lado, os microconídios apresentam de paredes finas e lisas, hialinas e unicelulares com pinos. O estado sexual produzido após o acasalamento, se assemelha a um *Arthroderma* (DE HOOG et al., 2017a).

#### **2.2.2.6 Lophophyton**

As colônias do gênero *Lophophyton* são planas com uma textura parecida com uma camurça e são brancas com uma tonalidade rosada. Algumas culturas mostram uma dobra radial. Os macroconídios, quando presentes, são geralmente de cinco a seis células, de parede fina a grossa, ligeiramente equinulados, ou cilíndricos com uma base estreita e ponta romba, 15-60 x 6-10  $\mu\text{m}$ . Os microconídios são ovóides a piriformes em forma (CABAÑES, 2020).

### **2.2.2.7 *Trichophyton***

A velocidade de crescimento, a morfologia e o pigmento das colônias variam de acordo com a espécie. Apresentam escassos números de macroconídios, alongados de paredes lisas e finas. Os microconídios se encontram de forma abundante, podem ser globosos, piriformes ou claviformes, sua disposição é solitária ou em grupos em ambos os lados da hifa dobre (DAVEL, 2009; FERNÁNDEZ, 2005; KWON-CHUNG, 1992). As espécies envolvidas na patologia humana são: *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton tonsurans* e outras que se diagnosticam com menor frequência como o *T. Trichophyton shoenleinii* e o *Trichophyton violaceum* (KWON-CHUNG, 1992).

### **2.2.3 Espécies mais comuns associadas a infecções por dermatofitose**

#### **2.2.3.1 *Microsporum canis***

*Microsporum canis* é um dermatófito zoófilo que coloniza a pele dos animais como gatos, cães e cobaias. Devido ao fato de que os hospedeiros são animais domésticos, há uma alta transmissão entre animais e os seres humanos (BONIFAZ, 2015; GRUNWALD; AMICHAÏ; SHEMER, 2015). *M. canis* é uma das espécies mais prevalentes no mundo que afeta a população infantil causando principalmente tinea capitis e tinea corporis. De forma menos frequente, afeta a pessoas adultas que apresentem fatores de risco associados, por tanto os sintomas clínicos de tinea capitis nestes pacientes geralmente são atípicas e polimórficas (AHMED et al., 2016; BONIFAZ, 2015; KHOSRAVI; SHOKRI; VAHEDI, 2016).

*M. canis* tem a capacidade fisiológica de invadir o folículo piloso por fora e por dentro do pelo (invasão ectotrix) e causar tinea capitis não inflamatória ou formas inflamatórias leves ou muito supurativas (HAY, 2016; JOHN; SCHWARTZ; JANNIGER, 2018). Em culturas de ágar Sabouraud, este fungo apresenta uma colônia algodonosa e branca, emitindo um pigmento amarelado ao reverso. Microscopicamente, *M. canis* apresenta hifas hialinas e tabicadas com elementos de frutificação conformados por macroconídios abundantes de aparência fusiforme e escassos microconídios (JOHN; SCHWARTZ; JANNIGER, 2018).

### **2.2.3.2 *Trichophyton rubrum***

Considerando que podem ser vários os sítios anatômicos para serem infectados por espécies de dermatófitos, o causador mais comum de *tinea pedis*, *tinea unguium*, *tinea cruris* e *tinea corporis* em todo mundo é o *Trichophyton rubrum* (SEEBACHER; BOUCHARA; MIGNON, 2008). *T. rubrum* é um microrganismo de crescimento lento, produz colônias planas de cor branco a avermelhado, apresentam uma superfície algodonosa. Depois de três a quatro semanas de incubação apresenta uma cor vermelha característica que pode ser observada de melhor forma na parte reversa da colônia, cabe ressaltar que algumas colônias carecem desta coloração avermelhada. Por outro lado, os microconídios podem ser escassos, se caracterizam por serem ovais e nascem aos lados das hifas sendo mais frequentes nas colônias granulares que nas colônias algodonosas e possuem forma de gotícula (ARENAS, 2008; SAHM; FORBES; WEISSFELD, 2009).

### **2.2.3.3 *Trichophyton mentagrophytes***

*Trichophyton mentagrophytes* é o causador da formação de tinha de pé, geralmente produz colônias de textura filamentosa e granulosa. As colônias granulosas são lesões adquiridas pelo contato com animais. As colônias filamentosas são de crescimento rápido, poder ser brancas algodonosas de cor amarelado, grossas ou pulverulentas. Produzem escassos microconídios esféricos (ARENAS, 2008; SAHM; FORBES; WEISSFELD, 2009). *T. mentagrophytes* possui diferentes tipos morfológicos, as cepas antropofílicas (filamentosos) ou algodonosas de cor branca e pulverulentas no centro, as zoofílicas são granulosas de cor branca, pulverulenta. As colônias granulares podem mostrar uma pigmentação avermelhada, o reverso pode ter um tom rosa e em ocasiões alaranjado, por isso pode ser confundido com *T. rubrum*. As colônias de *T. mentagrophytes*, apresentam microconídios pequenos, esféricos dispostos em grupos assim como também macroconídios esféricos de paredes lisas (ARENAS, 2008). As hifas em forma de espiral podem ser encontradas em um terço dos cultivos isolados. As cepas de *T. mentagrophytes* produzem urease e perfuram o pelo (SAHM; FORBES; WEISSFELD, 2009).

### 2.3 Tratamento das dermatofitoses: Antifúngicos tópicos e sistêmicos

Atualmente existem numerosos antifúngicos para o tratamento das dermatofitoses, a terapia pode ser tópica, sistêmica ou uma combinação de ambas dependendo da localização, extensão e severidade das lesões, a idade do paciente e da espécie do dermatófito envolvido na infecção (BERG; ERICKSON, 2001; GUPTA; BLUHM; BA, 2004; MILLIKAN, 2001; SAHOO; MAHAJAN, 2016a). Os antifúngicos de ação tópica se aplicam no local da lesão, geralmente vem em apresentações como géis, cremes, soluções, pós ou pomadas. No entanto, existem vários estudos clínicos que indicam que estes tipos de terapia fracassam com *tinea unguium*, *tinea capitis* ou *tinea pedis* (CERVERA; MAESTRE; MORENO, 2001; SAHOO; MAHAJAN, 2016b).

O sucesso da terapia tópica no tratamento das dermatofitoses depende de fatores relacionados com o agente causal e com as propriedades físico-químicas do antifúngico. O consumo de antifúngicos tópicos tem aumentado; por exemplo o cetozonazol é um dos medicamentos mais receitados, seguido pelo clotrimazol e o miconazol (SEEBACHER, 2004). Este fato se deve a que os antifúngicos tópicos produzem menos efeitos secundários que os sistêmicos e por isso são prescritos com menos limitações frente a qualquer suspeita de diagnóstico (CERVERA; MAESTRE; MORENO, 2001; MÜLLER; KARA-JOSÉ; CASTRO, 2013).

Os antifúngicos de ação sistêmica estão indicados principalmente em *tinea capitis*, *tinea unguium* e nas dermatofitoses severas ou disseminadas em pacientes imunodeprimidos (ELEWSKI et al., 2013; HAINER, 2003; MILLIKAN, 2001). Embora exista uma grande variedade de antifúngicos tanto tópicos como orais para o tratamento das dermatofitoses, o sucesso para tratamento de *tinea unguium* é baixo, com uma taxa de fracasso de aproximadamente 35% (HAY, 2016). Nestes casos é recomendável a terapia combinada (BARAN et al., 2000; KREIJKAMP-KASPERS et al., 2017; LECHA, 2008; SEEBACHER, 2004).

Os problemas nos tratamentos já mencionados têm incentivado e orientado à investigação a procurar alternativas como substâncias puras ou extratos brutos de plantas medicinais que sejam capazes de combater de forma eficaz a doenças

causadas por fungos sem causar efeitos secundários nem resistência nos pacientes (DABUR et al., 2004; FENNER et al., 2005).

#### **2.4 Plantas medicinais: Uma alternativa para tratamento de doenças provocadas por fungos**

Desde os tempos antigos, as plantas medicinais e fitoterápicos mais simples têm sido usados em todas as partes do mundo para o tratamento e alívio de várias doenças. Embora o uso de plantas medicinais seja tão antigo quanto a própria humanidade, sua aplicação controlada, o isolamento e a caracterização de substâncias ativas, começou apenas no início do século XIX (DJORDJEVIC, 2017; VISHWAKARMA et al., 2013).

Países em desenvolvimento ainda continuam usando esses métodos terapêuticos tradicionais. A OMS informou que mais de 80% da população destes países, depende da terapia tradicional devido a sua relação custo-benefício (PEŠIĆ, 2015), sem contar que as plantas são consideradas o recurso principal para a descoberta de medicamentos, chegando a uma alta porcentagem o número de medicamentos obtidos por síntese de derivados delas (BAUER; BRÖNSTRUP, 2014; FITZGERALD; HEINRICH; BOOKER, 2020).

Pesquisas revelam que dez por cento das plantas vasculares são usadas com fins medicinais, e estima-se que existem entre 350.000 (JOPPA et al., 2011) e meio milhão de espécies diferentes (PIMM et al., 2014; SALMERÓN-MANZANO; GARRIDO-CARDENAS; MANZANO-AGUGLIARO, 2020). Através de estudos tem-se demonstrado que estas são fontes importantes de metabolitos secundários (ANAND et al., 2017; EFFERTH, 2012; PANT; PANDEY; DALL'ACQUA, 2021; VERPOORTE; MEMELINK, 2002), os ácidos fenólicos, flavonoides, taninos e cumarinas são alguns exemplos destes compostos encontrados e extraídos das plantas medicinais.

Estudos revelam que os polifenóis, ácidos fenólicos e alguns flavonoides podem ter efeitos saudáveis em humanos, atuando como anticancerígenos, anti-hipertensivos, antialérgicos, anti-inflamatórios, antioxidantes e agentes

antimicrobianos. A atividade antimicrobiana destes tem sido extensivamente investigada principalmente contra bactérias (DAGLIA, 2012; DE ANDRADE MONTEIRO; RIBEIRO ALVES DOS SANTOS, 2020). No entanto, ainda falta abordar sobre o potencial antifúngico de vários compostos assim como aprofundar sobre o mecanismo de ação de várias substâncias, sua citotoxicidade, e o sinergismo entre estes compostos ou com outros antifúngicos tradicionais (DE ANDRADE MONTEIRO; RIBEIRO ALVES DOS SANTOS, 2020).

Por exemplo, em estudos realizados da planta australiana *Melaleuca alternifolia* Cheel (*Myrtaceae*) obteve-se o óleo essencial da árvore (Tea Tree Oil), o qual demonstrou atividade antifúngica pela ação direta dos compostos ativos, terpinen-4-ol e 1,8-cineol em concentrações variadas, evidenciando que atuam sobre as estruturas celulares não só de fungos como também sobre bactérias. Este óleo é comumente usado para o tratamento de infecções na pele provocada por fungos de gêneros *Candida* e *Malassezia* e em *Tinea unguium* causada por dermatófitos (HAMMER, 1998, 2002; HAMMER; CARSON; RILEY, 2000; VAZQUEZ et al., 2000; WHO, 2002).

Estudos feitos sobre os extratos etanólicos, óleos essenciais e compostos de natureza sulfúrica isolados dos bulbos de alho (*Allium sativum* L.) demonstraram que estes são capazes de produzir um efeito antifúngico relevante, atribuído aos componentes ativos alicina e ajoeno presentes na planta frente às cepas *Candida*, *Malassezia*, *Cryptococcus* e *Aspergillus*, assim como também frente dermatófitos e ao fungo *Paracoccidioides brasiliensis* (ANKRI; MIRELMAN, 1999; DE GONZÁLEZ et al., 1998; LEDEZMA et al., 2000; NAGANAWA, 1998; SAN-BIAS et al., 1997; WHO, 1999). Foi demonstrado também que a alicina, apesar de ser efetiva, tem uso limitado devido a sua instabilidade, por outro lado o ajoeno produto de degradação da alicina, demonstrou ser um composto mais estável e a formulação tópica para o tratamento de *tinea pedis*, *cruis* e *corporis* mostrou resultados satisfatórios (LEDEZMA et al., 2000; WHO, 1999). Outra investigação realizada demonstrou que o óleo, extratos e infusões da planta *Eucalyptus globulus* Labill apresentam atividade antifúngica em concentrações

entre 54% e 95% do composto ativo 1,8-cineol. O uso tópico do extrato bruto e o óleo essencial produziram irritação dérmica e dermatites ao contato (WHO, 2002).

Por outro lado, pesquisas realizadas sobre as plantas *Thymus vulgaris* L. e *Thymus zygis* L. indicaram que estas são fontes de moléculas de timol e carvacrol, substâncias responsáveis de demonstrar atividade antifúngica frente *Cryptococcus neoformans* e espécies de *Candida*, *Aspergillus*, *Kaprolegnia* e *Zygorhynchus* (WHO, 1999).

Outras moléculas antibióticas produzidas por plantas são as defensinas, de natureza peptídica e ricas em cisteína, estas são capazes de inibir o crescimento dos fungos produzindo neles mudanças morfológicas e danos em algumas das suas estruturas celulares (DE LUCCA; WALSH, 1999; HANCOCK; CHAPPLE, 1999; WONG et al., 2014). Nas sementes da planta de milho, *Zea mays* L., por exemplo, está presente a proteína zeamatina, que possui a função de proteger a planta de fungos patógenos pela capacidade de produzir lises osmótica e frente ao patógeno humano *Candida albicans*, a molécula é capaz de impedir o crescimento em uma concentração inibitória mínima (MIC) de 0,5 mg/mL (DE LUCCA; WALSH, 1999; SELITRENNIKOFF, 2001; STEVENS, 2002; WONG et al., 2014).

Outros exemplos de plantas com atividade antifúngica promissora e seus derivados (flavonoides, taninos, cumarinas, quinonas, lignanas e leolignanas) se apresentam na Tabela 2:

**Tabela 2. Metabólitos derivados de plantas com propriedades antifúngicas**

Tipo de substância	Classe ou tipo de metabólito	Cepa sobre a qual atua	Planta
Flavonoides	Flavan-3-ols	<i>Candida</i>	<i>Syzygium</i>
			<i>Cordatum</i>
			Hochst. ex Krauss
	Baicalina, galotaninos	<i>Candida</i>	<i>Scutellaria</i>

			<i>baicalensis</i>
			Georgi
	Ulopterol	<i>M. canis</i>	<i>Skimmia</i>
Cumarinas			<i>laureola</i>
			(Candolle)
			Siebold &
			Zucc. ex
			Walp
	5,8-	<i>T. interdigitale, M. gypseum</i>	<i>Ferula</i>
	dihidroxiumbelliprenina		<i>asafoetida</i>
			Linn
Terpenos o	Triterpernos	Dermatófitos	<i>Satureja</i>
terpenoides			<i>khuzestanica</i>
			Jamzad
	Punicalagin	<i>Candida</i> spp.	<i>Terminalia</i>
	Punicalin		<i>catappa</i> Linn
	Punicalagin	<i>T. mentagrophytes; T.</i>	
		<i>rubrum; M. canis; M.</i>	
		<i>gypseum</i>	<i>Punica</i>
Taninos			<i>granatum</i> L.
	Ácido elágico, ácido gálico, punicalinas	<i>C. albicans, Cryptococcus neoformans, Aspergillus fumigatus</i>	
	Lambertianin C, Elagitaninos	<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Rubus idaeus</i> L

---

(DE ANDRADE MONTEIRO; RIBEIRO ALVES DOS SANTOS, 2020)

A identificação de novas moléculas com potencial antifúngico para a fabricação de novos medicamentos, mais eficazes e menos tóxicos, continua sendo um desafio, pois o uso prolongado dos antifúngicos comerciais leva ao

desenvolvimento de resistência frente algumas espécies fúngicas (DE ANDRADE MONTEIRO; RIBEIRO ALVES DOS SANTOS, 2020; DE OLIVEIRA SANTOS et al., 2018).

Por exemplo o Brasil apesar de possuir mais de 22% do total de plantas no mundo (mais de 55 000 espécies) (SAVI; ALUIZIO; GLIENKE, 2019; ZAPPI et al., 2015), apenas 8% destas espécies foram estudadas com relação a suas propriedades bioativas (RODRIGUES et al., 2014; SIMÕES et al., 2003). Por esse motivo o Brasil é considerado como alvo de pesquisas encaminhadas à busca de novas substâncias com atividade farmacológica, principalmente com atividade antifúngica uma área que não tem sido tão investigada como outras.

#### **2.4 Uso de plantas para o tratamento de infecções fúngicas superficiais no Brasil**

Pesquisas epidemiológicas realizadas no Brasil mostram um aumento significativo da propagação de micoses superficiais (ACHTERMAN; WHITE, 2012; BIASI-GARBIN et al., 2016; CHIACCHIO et al., 2014; GODOY-MARTINEZ et al., 2009). Isto se deve provavelmente a que a eficácia terapêutica dos tratamentos tradicionais está limitada pelos efeitos colaterais e/ou resistência, a interrupção das terapias e o alto custo dos tratamentos (DENNING; HOPE, 2010; ROUTH et al., 2014), por este motivo, justifica-se a busca por novas alternativas terapêuticas de origem vegetal (NEWMAN; CRAGG, 2020; YEUNG, 2011).

As plantas por apresentar diferentes propriedades biológicas, representam uma opção viável para o tratamento de doenças incluindo aquelas causadas por fungos (BIASI-GARBIN et al., 2016). Cientificamente já tem se comprovado a evidência de plantas com potencial antimicrobiano, vários extratos e óleos de plantas brasileiras, estão diretamente relacionados com propriedades antifúngicas (HOLETZ et al., 2002; MABONA et al., 2013; SOARES et al., 2013, 2014; SOUZA et al., 2002a; ZIMMERMAM-FRANCO et al., 2013).

Plantas da família Leguminosae são descritas como ricas fontes de flavonoides e possuem propriedades antifúngicas. Foi assim, como em um estudo desta família no Sul do Brasil, se determinaram diferentes concentrações

fungicidas e fungistáticas dos extratos metanólicos da planta *Mimosa pigra* L., contra os dermatófitos *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *E. floccosum*, e *M. gypseum* (DE MORAIS et al., 2017).

Da mesma forma, também foi avaliada a atividade anti-dermatofítica *in vitro* de 23 extratos brutos obtidos a partir de nove plantas do território de Caatinga no Nordeste do Brasil. Os extratos foram testados em diferentes concentrações contra as cepas de referência *T. rubrum* ATCC 28189 e *T. mentagrophytes* ATCC 11481, e 33 isolados clínicos de dermatófitos. Todas as plantas mostraram um efeito fungicida contra ambas as espécies e os extratos de *Eugenia uniflora* L., *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz e *Persea americana* Mill, também exibiram um efeito fungicida contra todos os isolados clínicos do complexo *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* (BIASI-GARBIN et al., 2016).

Em outra pesquisa também foram avaliadas *in vitro* cinco plantas do Cerrado contra isolados da cepa *T. rubrum*. Todos os extratos mostraram atividade contra a esta cepa, embora os extratos mais ativos foram os das plantas *Hyptis ovalifolia* Benth e *Eugenia uniflora* L. (SOUZA et al., 2002b).

Uma investigação recente sobre as plantas *Schinus terebinthifolia* Raddi., *Persicaria hydropiperoides* (Michx.), *Eugenia uniflora* Linn., e *Equisetum hyemale* Linn., originárias do sul do Brasil, demonstrou que os óleos essenciais e extratos metanólicos e etanólicos destas plantas aparentaram um potencial fungicida frente as cepas *M. canis*, *M. gypseum* e *T. mentagrophytes* resistentes a cetoconazol e itraconazol (SANTOS et al., 2013).

Considerando o potencial das plantas brasileiras e os relatos populares o presente estudo avaliou o potencial antifúngico dos extratos hidroalcoólicos de *Achyrocline satureioides* frente as cepas *T. mentagrophytes*, *M. canis*, *T. rubrum* e *T. rubrum* FOC.

## 2.5 Plantas da família Asteraceae

A família Asteraceae é uma das maiores famílias de plantas, com mais de 1600 gêneros e 2500 espécies em todo o mundo (ROLNIK; OLAS, 2021). Esta

família é encontrada em regiões áridas e semiáridas de áreas subtropicais, e as plantas pertencentes a esta família estão distribuídas ao redor do mundo (I. ACHIKA et al., 2014).

Estas plantas apresentam propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, antioxidantes e hepatoprotetoras, bem como diuréticas e cicatrizantes de feridas. Os efeitos farmacológicos podem ser atribuídos à presença de compostos ativos, como polifenóis, ácidos fenólicos, flavonoides, acetilenos e triterpenos (ROLNIK; OLAS, 2021).

No Brasil, Asteraceae compreende 180 gêneros e 1900 espécies, que são encontradas principalmente nos estados de Minas Gerais e Bahia (NAKAJIMA; SEMIR, 2001; ROQUE et al., 2018) representando o 10% do total da flora de angiospermas de Brasil, compreendendo espécies herbáceas, anuais ou perenes, subarbustivas ou arbustivas e raramente arbóreas (ARAÚJO et al., 2021).

### **2.5.1 *Achyrocline satureioides***

#### **2.5.1.1 *Achyrocline satureioides* (LAM.) DC**

A planta, conhecida popularmente como macela ou marcela é uma espécie medicinal, pertencentes à família Asteraceae e o gênero *Achyrocline*, sendo comumente usada no Brasil e se encontra bem descrita na literatura, porém ainda com cultivo incipiente, considerando sua importância, distribuição e potencial econômico. O gênero *Achyrocline*, possui aproximadamente 30 espécies afro-americanas, que estão distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, na África, América do Sul e central (BREMER; ANDERBERG, 1994).

*A. satureioides* trata-se de um subarbusto de 30-50 cm de altura, ramificado, muito aromático. Possui hastes delicadas, lanceoladas lineares de 3-5 cm de comprimento, folhas com dobras em ambos os lados de aparência esbranquiçada cinza (NUÑEZ, 2000). As flores estão dispostas em capítulos de 4 a 8 cada um, estes são numerosos, pequenos, cilíndricos, amarelados ou avermelhado, organizados em glomérulos terminais densos como se observa na Figura 2:



**Figura 2.** (A) *Achyrocline satureioides* (B) Flores e folhas *A. satureioides*. Fonte: [http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open\\_sp.php?img=15004](http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=15004)

No Brasil *A. satureioides*, está bem distribuída desde Minas Gerais até chegar à Argentina, no entanto também é frequente em países como Uruguai, Paraguai, Bolívia, Peru, Colômbia e Venezuela, ocorrendo em ambientes de até 1700 m de altitude e em áreas abertas com pastagens, beiras de estradas, bordas de matas, áreas desmatadas, além de campos e áreas de Cerrado Rupestre (BROUSSALIS et al., 1988; DEBLE, 2007; VOLPE, 2006). Geralmente a macela floresce e frutifica no verão-outono, adaptando-se melhor em climas amenos (DICKEL, 2011; LORENZI, 2002).

Segundo a medicina popular a macela é utilizada em infusões, como digestivo, sedativo, anti-inflamatório, antiespasmódico, analgésico, diurético, antimicrobiano, antiviral e protetor hepático (CACERES et al., 1991; DESMARCHELIER; COUSSIO; CICCIA, 1998; ESCOBAR et al., 2012; SIMÕES et al., 1988b).

Investigações sobre a composição química da planta revelaram que extratos das inflorescências de *A. satureioides* possuem quercetina, 3-O-metil-quercetina e luteolina como flavonoides principais (CARINI et al., 2015a). Estes compostos já têm sido isolados e demonstrado *in vitro* algumas atividades farmacológicas, como a inibição de espécies reativas de oxigênio (ROS), sendo esta aplicação muito relevante considerando que as ROS têm sido implicadas na

patologia de mais de 100 patologias humanas (ARREDONDO et al., 2004; CARINI et al., 2015; HALLIWELL, 2001; SIMÕES et al., 1988b).

Entre os estudos realizados sobre o potencial antimicrobiano de *A. saturoioides*, encontra-se uma pesquisa onde foram testados os extratos aquosos da planta frente cepas de *Staphylococcus* spp. Os testes demonstraram que em determinadas concentrações os extratos conseguiram inibir 95% o crescimento da bactéria (CORRÊA et al., 2016).

Em outro estudo, foi avaliado o potencial antimicrobiano de três extratos (extrato aquoso liofilizado, extrato etanólico liofilizado e o extrato hidroalcoólico obtido por secagem em pulverização) das inflorescências de *A. saturoioides*. Os resultados revelaram que o extrato etanólico liofilizado exibiu um amplo espectro de atividade frente bactérias patógenas intestinais como *Bacillus cereus* e *S. aureus* comparada com a atividade da amoxicilina, sugerindo-se assim o uso potencial de *A. saturoioides* como agente coadjuvante no tratamento de doenças intestinais induzidas por bactérias e com alta taxa de resistência a antibióticos (MORESCO et al., 2017).

Pesquisas realizadas dos extratos etanólicos, hexânicos e de clorofórmio de *A. saturoioides* foram avaliados *in vitro* para estabelecer o potencial antifúngico frente a fungos fitopatogênicos para aplicação em campos agrícolas. Os resultados demonstram que os extratos com hexano e clorofórmio foram capazes de inibir o crescimento das cepas *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides* e *Sclerotium rolfsii* (VOGT et al., 2010).

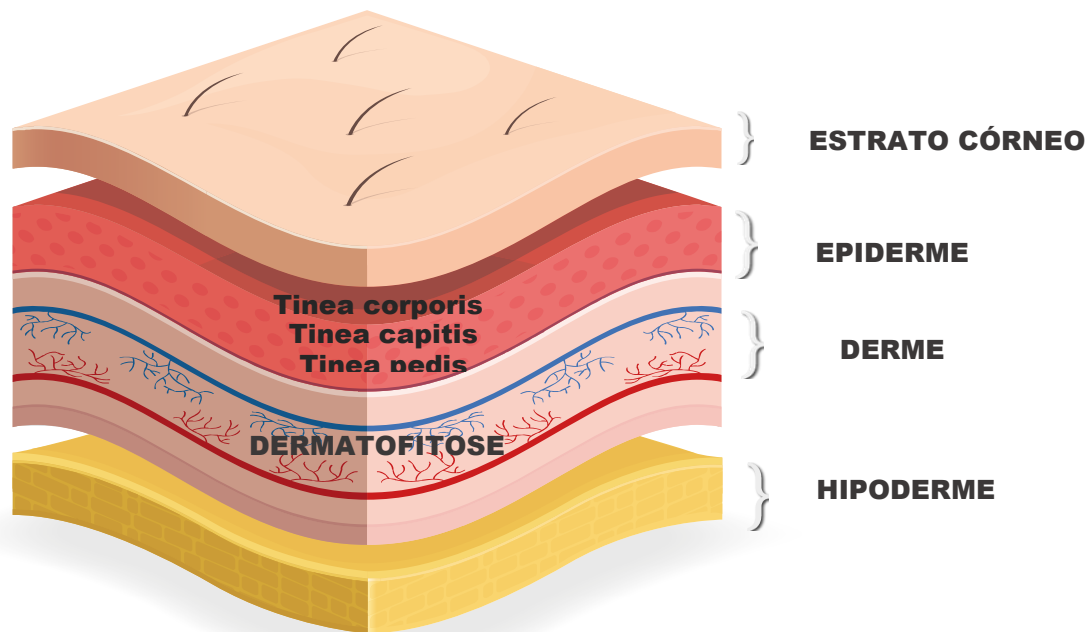
## **2.6 Sistemas de liberação de fármacos antifúngicos para uso tópico**

A liberação tópica de medicamentos antifúngicos através de diferentes tipos de formulações tem se tornado uma das melhores alternativas para combater as infecções dermatofíticas, garantindo seu acesso direto e maior retenção no alvo. Atualmente, vários antifúngicos como o cetoconazol, o itraconazol e o clotrimazol são administrados sobre a pele por friccionamento ou espalhamento (DE JALÓN et al., 2001).

No entanto, as formulações convencionais precisam de alta dose e administração repetida, o qual está associado a contrair riscos maiores de toxicidade local e sistêmica. Isso ocorre com a liberação tópica de medicamentos antifúngicos, já que o uso frequente ou prolongado destes fármacos pode causar reações adversas na pele como prurido e alergia (REDDY; YANG, 2011).

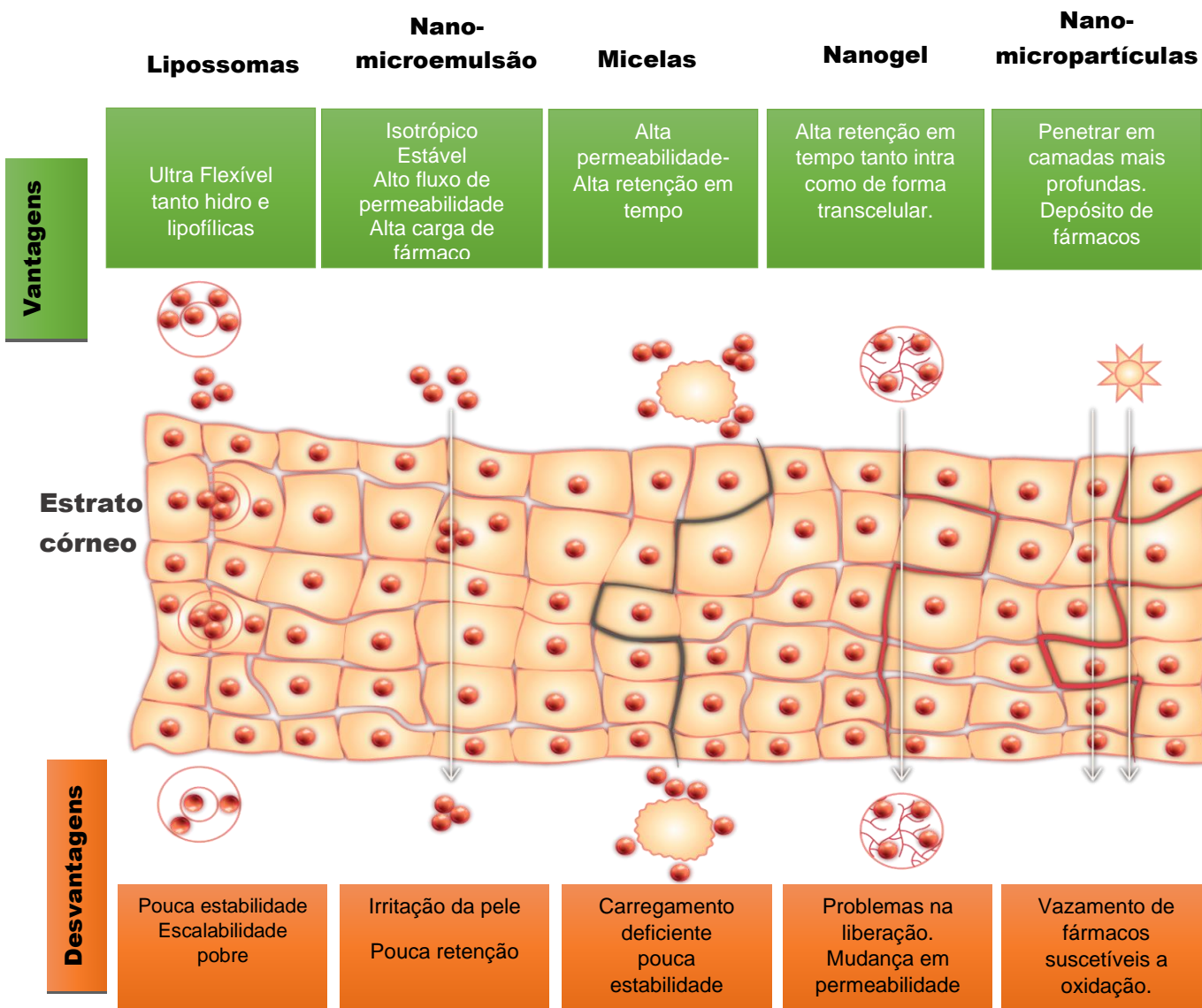
Por esta razão, novas alternativas de administração de medicamentos incluindo lipossomas, niosomas, ethosomas, microemulsões, nanopartículas, micelas e microesferas vêm sendo propostos com o objetivo de reduzir os efeitos colaterais e melhorar propriedades como a especificidade no local de tratamento, reduzir a toxicidade sistêmica e aumentar a eficácia e os níveis de biodisponibilidade (SEGALE et al., 2015).

A pele é formada por três camadas principais: uma camada externa fina ou epiderme, uma camada intermediária mais grossa chamada derme e uma camada mais profunda e espessa conhecida como hipoderme. Por outro lado, na camada mais externa da epiderme se encontra o estrato córneo que está composto de corneócitos e células queratinizadas. Quando a pele é atacada por microrganismos, como bactérias ou fungos, a pele sofre alterações, provocando problemas e desordens, impedindo cumprir suas funções como barreira. Na Figura 3 pode-se observar os tipos de infecções fúngicas comumente vistas nas diferentes camadas da pele.



**Figura 3.** Camadas de pele com infecções fúngicas. Fonte: Figura do próprio autor

Por tal motivo, para que um fármaco de uso tópico tenha sucesso, primeiro deverá penetrar a barreira principal da pele, ou seja, o estrato córneo, para conseguir atingir as outras camadas cutâneas (REDDY; YANG, 2011). Na Figura 4 se mostra os mecanismos de penetração empregados pelos diferentes portadores de medicamentos tópicos através do estrato córneo.



**Figura 4.** Representação esquemática do estrato córneo e os mecanismos de penetração de diferentes sistemas carregadores de fármacos. Fonte: Figura do próprio autor

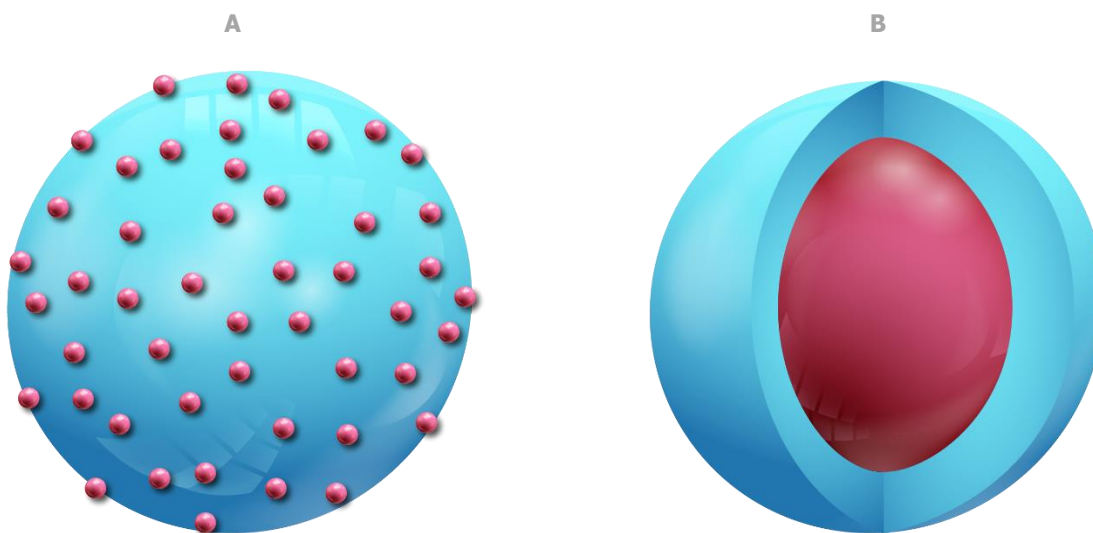
Diante disso, nesta pesquisa foram propostos dois tipos sistemas de liberação nanodispersos (micropartículas e micelas), para encapsular os ativos principais presentes na planta *A. saturoioides* e desta forma poder comparar a atividade antifúngica dos extratos brutos e das formulações frente às diferentes cepas dermatofíticas.

### 2.6.1 Micropartículas

Os sistemas microparticulados são comumente explorados para a administração oral ou parenteral, porém, eles também podem ser úteis para a entrega de fármacos para a pele. Estes sistemas têm a capacidade de liberar os

fármacos por longos períodos ajudando a reduzir a absorção sistêmica e efeitos adversos (DE JALÓN et al., 2001).

As micropartículas (MPs) podem-se encontrar como partículas sólidas (microesferas) ou pequenas gotas de líquido cercadas por uma parede feita de polímeros naturais ou sintéticos (microcápsulas); com peso molecular e grau de permeabilidade diferentes, permitindo assim a liberação de uma quantidade controlada de ingrediente ativo como se mostra na Figura 5:



**Figura 5.** Esquema ilustrativo diferenciando os tipos de micropartículas (A) Microesferas (matriz polimérica) e (B) Microcápsulas (Cápsulas com parede polimérica e cavidade oca ou aquosa). Fonte: Figura do próprio autor

Está comprovado que o tamanho das MPs pode oscilar entre 1 e 1000  $\mu\text{m}$ , podendo capturar macromoléculas como vacinas, ácidos nucleicos e proteínas. Independentemente do tamanho, as MPs são consideradas um sistema altamente eficiente para proteger um fármaco de condições externas que possam prejudicar sua eficácia terapêutica (JYOTHI et al., 2010).

Alguns estudos vêm testando novos sistemas de distribuição baseados em micropartículas para terapia antifúngica tópica. Em uma pesquisa prepararam micropartículas à base de poli(ácido láctico-glicólico) (PLGA) incorporando clotrimazol para tratamento de candidíases. Os resultados mostraram que as

microesferas alcançaram melhores resultados terapêuticos, devido a ter ocorrido uma penetração dérmica em comparação com o gel comercializado inclusive após 96 h da aplicação, concluindo-se que as micropartículas de PLGA podem ser portadores promissores para a entrega do clotrimazol por via intradérmica para tratamento de infecções fúngicas invasivas.

Segale e colaboradores (2015) desenvolveram micropartículas carregadas com Itraconazol. Nesse estudo foi demonstrado que o sistema de partículas foi capaz de proteger o fármaco evitando sua conversão de estado amorfo à forma cristalina. Esse comportamento permitiu manter inalterado a ação terapêutica do fármaco no processo de liberação, pois sua atividade melhorou de forma considerável em comparação com o medicamento livre (SEGALE et al., 2015).

Em outro trabalho também se evidenciou a melhoria das propriedades terapêuticas do outro fungicida (tebuconazol) após seu processo de microencapsulação. Nesta investigação, foram desenvolvidas micropartículas à base de tebuconazol (TEB) com o polímero poli-3-hidroxibutirato (P3HB). Os dados obtidos da liberação *in vitro* do TEB mostraram o aumento do potencial de atividade antifúngica contra fungos fitopatogênicos *Fusarium moniliforme* e *Fusarium solani* em comparação com a atividade do fármaco puro (SHERSHNEVA et al., 2019).

Geralmente os sistemas microparticulados estão formados por polímeros biodegradáveis naturais, já que estes podem atuar como portadores de diferentes agentes terapêuticos no fornecimento controlado de fármacos através da rota tópica (REDDY; YANG, 2011).

A quitosana por exemplo é um deles; trata-se de um polissacarídeo catiônico, que tem sido amplamente utilizado para a preparação de nano-/micropartículas. Sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixa toxicidade, facilidade de preparo, são algumas das características que tem chamado a atenção para que este polímero se torne uma valiosa ferramenta para a preparação de novos sistemas de distribuição de fármacos (DUCEPPE; TABRIZIAN, 2010; WADHWA et al., 2009; ZHU et al., 2016).

Portanto o tipo de escolha de polímeros para o desenvolvimento de um sistema com micropartículas dependerá do tipo de ativo que será encapsulado, a via de administração e o alvo a ser atendido (SINGH; HEMANT; SHIVAKUMAR, 2010).

### **2.6.2 Micelas**

As micelas são um conjunto de moléculas surfactantes em escala nanométrica, dispersas em um líquido que contém uma parte lipofílica e outra hidrofílica. Este tipo de sistema é um dos preferidos como carregadores de fármacos hidrofóbicos, motivo pelo qual estão sendo utilizados para a entrega tópica de fármacos antifúngicos (KATAOKA; HARADA; NAGASAKI, 2001; PATRA et al., 2018; TORCHILIN, 2006).

Pesquisas têm demonstrado que os sistemas micelares de surfactantes não iônicos são menos tóxicos e mais compatíveis com os surfactantes aniônicos e catiônicos, entre eles estão: o polioxietileno, poloxamer, poloxamina, polissorbatos e polissorbatos de polioxietilenos, os quais se ligam às proteínas da pele através interações hidrofóbicas fracas que não afetam a fisiologia da pele (GARG et al., 2020).

Em comparação a outros tipos de sistemas, a incorporação de fármacos em micelas traz algumas vantagens como o aumento na solubilidade dos fármacos, assim como também do coeficiente de partição dos ativos (fase aquosa-fase orgânica) e o acúmulo por sobressaturação dos medicamentos nos folículos capilares e na pele (KATAOKA; HARADA; NAGASAKI, 2001).

Bachhav e colaboradores (2011) investigaram sobre a atividade antifúngica de novas dispersões aquosas contendo nitrato de econazol e fluconazol. As micelas foram desenvolvidas utilizando novos copolímeros de polilactida hexila substituída (MPEG-hexPLA) em bloco com os antifúngicos. Após a caracterização das micelas, os autores encontraram que além de apresentar um tamanho nanométrico na sua estrutura ficou evidenciado a formação de uma armadilha onde se encontravam os fármacos (BACHHAV et al., 2011). Os resultados *in vivo* mostraram que o uso de sistemas micelares aumentou os níveis de

biodisponibilidade dos fármacos assim como também sua contribuição por via de penetração folicular, evidenciando-se uma melhoria significativa na eficácia clínica (BACHHAV et al., 2011).

Em outro estudo foi avaliado o efeito da supersaturação induzida pela formação de micelas do itraconazol/Soluplus® por dispersão sólida. Os resultados mostraram que as micelas de Soluplus® envolveram o Itraconazol molecular dentro do núcleo o qual promoveu a quantidade de fármaco livre na cavidade intestinal, facilitando o transporte do medicamento através da camada limite aquosa (ABL), conseguindo-se desta forma, uma melhor absorção, devido ao transporte passivo por meio das membranas biológicas (ZHONG et al., 2016).

Ainda, em decorrência dos estudos de sistemas de liberação de fármacos e suas vantagens foram propostos sistemas poliméricos micelares usando soluplus® para incorporar os ativos mais importantes da planta *A. saturoioides* e avaliar seu potencial antifúngico frente as cepas dermatofíticas.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antifúngico *in vitro* dos extratos hidroalcoólicos de folhas e flores da espécie *A. satureioides* e metabólitos principais em sistemas de liberação frente a diferentes cepas dermatofíticas

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliação da atividade antifúngica dos extratos de *A. satureioides* e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM).
- Avaliação da citotoxicidade dos extratos de folhas e flores de *A. satureioides* frente a diferentes linhagens celulares
- Determinação da capacidade antioxidante dos extratos de *A. satureioides*
- Investigação do mecanismo de ação dos extratos vegetais sobre os dermatófitos
- Determinação do perfil químico dos extratos de folhas e flores de *A. satureioides*
- Preparação de micropartículas por Spray-dryer e micelas poliméricas por hidratação de películas finas contendo quercetina e 5-O- cafeoilquínico
- Caracterização dos sistemas de liberação
- Avaliação da atividade antimicrobiana das formulações
- Avaliação da capacidade de penetração dos ativos em pele humana por tape stripping

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Solventes, reagentes e meios de cultura

Acetonitrila – Synth®

Ácido 3-[N-morfino] propanosulfônico (MOPS) – Acros Organics

Ácido acético – Synth®

Ácido 5-O- cafeoilquínico - Tokyo Chemical Industry

Ácido etilenodiamino tetracético (EDTA), sal sódico – Sigma-Aldrich

Água ultrapura: Merck Millipore®, obtida em modelo Direct® – Q 3 UV.

Anfotericina B de Streptomyces – Sigma-Aldrich

Bicarbonato de sódio – Merck

Calcofluor White- Sigma Aldrich

Cetoconazol- Sigma Aldrich

Cloreto de potássio – Synth®.

Dimetilsulfóxido – Synth®

Ergosterol – Sigma Aldrich

Etanol – Qhemis®-VWR chemicals

Glicose – Sigma Aldrich

Fosfato dibásico de sódio– Synth®.

Fluconazol – Sigma Aldrich

Fluoromount-G Thermofisher

Hidróxido de potássio – Merck

Meio ágar Sabouraud – Acumedia

Meio ágar Potato Dextrose-Acumedia

Meio RPMI-1640 – Sigma-Aldrich

Metanol®– Synth e Qhemis

Quercetina – Tokyo Chemical Industry

Resazurina – Sigma-Aldrich

Soluplus-BASF® Chemical Company

Tripsina-EDTA – Sigma Aldrich

Tween 80 – Synth®.

Vermelho do Nilo- Sigma Aldrich

## 4.2 Equipamentos

Agitador orbital – Innova 4430

Autoclave vertical – Fabbe 103

Balança analítica: Marte®, modelo AY220

Balança analítica: Micronal, modelo AB 204

Banho-maria: Quimis, modelo 0226M1

Bomba de vácuo: Primatec

Câmara de fluxo laminar: Veco

Câmara de Neubauer: Boeco

Câmara de ultravioleta: 254 nm

Cartucho para extração em fase sólida: Agilent SampliQ® C18

Centrífuga Refrigerada: Eppendorf AG/5804R

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência 1 (LC-UV, Thermo®, modo analítico): bomba binária, desgaseificador, injetor manual Rheodyne de 6 pórticos com loop de 20 µL, detector UV de comprimento de onda variável UltiMate 3000 VWD, programa gerenciador do cromatógrafo e de dados Chromeleon™ CDS 6x.

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência 2 (LC-DAD/UV, Perkin Elmer Flexar®, modo analítico e semipreparativo): bomba quaternária, desgaseificador, injetor manual Rheodyne® de 6 pórticos com loop de 20 e 1.000 µL, detector UV/VIS de comprimento de onda variável, detector PDA/UV, programa gerenciador do cromatógrafo e de dados Chromera® 4.1.0.6386.

Cromatógrafo Líquido de Ultra Eficiência (UPLC-QTOF-MS/MS, Waters®, modo analítico): bomba quaternária, desgaseificador, injetor automático, Acquity UPLC Waters®, fonte de ionização- ESI, acoplado com detector quadrupolo/tempo de voo (XEVOQToF, Waters®).

Cubetas de quartzo: para espectrofotometria, capacidade 5mL

Espectrofotômetro Uv-vis: Bel, modelo UV-M51

Espectrofotômetro Uv-vis: Agilent CARY 600.

Estufa de secagem de material vegetal com circulação de ar: Fanem®, modelo 315 SE.

Microscópio de Fluorescência Confocal (Carl Zeiss LSM 800 com Airyscan)

Moinho de facas: Tecnal®, modelo TE 148.

pHmetro digital: MS Tecnopon Instrumentação, modelo mPA-210

Placas de 24-well: Costar, Kasvi

Placas de 96-well: flat bottom – TPP, Costar, Kasvi

Rotaevaporador: Heidolph®, Germany.

Rotaevaporador: Fisatom, modelo 804

Spray dryer: Buchi-191

Programa de análise de dados e construção de gráficos: GraphPad Prism® 5 e Microsoft® Excel 2016.

Ultrassom: Unique®, modelo USC – 2800, frequência 40 KHz.

Vidrarias em geral

Vortex: Kasvi Multimixer, modelo K40-10208

Microscópio eletrônico de Varredura de alta resolução microscópio S-4800 (Número de série: HI-9269-0009).

### **4.3 Material Vegetal**

A espécie *A. saturoioides* foi adquirida da Coleção de Plantas medicinais do CPQBA, cujo cultivo é de responsabilidade do Professor Dr. Ílio Montanari Junior, e coletada na cidade de Campinas-SP sob as coordenadas 22° 48' S; 47° 07' W. O registro de uso pelo SISGEN está sob cadastro número AD73F75.

#### **4.3.1 Obtenção dos extratos hidroetanólicos**

500 g de folhas e de flores secas e moídas de *A. saturoioides* (droga vegetal DV) foram submetidas à extração com etanol 70% por maceração à 40° C com agitação ocasional. A maceração foi realizada durante 5 dias, substituindo o solvente em 24 e 72 h. A proporção entre droga vegetal e líquido extrator foi de 1:15 (3,75 L m/v). Ao término da maceração as soluções extrativas foram filtradas, reunidas e levadas a rotaevaporador a 40-45°C, sob pressão reduzida. Em seguida os extrativos foram congelados em frascos de vidro a -80°C para submetê-los a processo de liofilização a fim de eliminar todo o conteúdo de água. Finalmente os extratos obtidos foram armazenados sob refrigeração em frasco âmbar previamente tarados (ODA et al., 2019).

#### **4.4 Microrganismos e condições de cultivo**

As cepas dermatofíticas utilizadas para esta pesquisa estão descritas na Tabela 3.

**Tabela 3.** Linhagens fúngicas

<b>Linhagem</b>	<b>Denominação</b>	<b>Isolada ou cedida</b>
<i>Trichophyton rubrum</i>	Tr1	Isolado clínico cedido pela Prof <sup>a</sup> Dra. Ana Marisa Fusco-Almeida
<i>Trichophyton rubrum</i>	Tr1 FOC	Cedida pela Fundação Oswaldo Cruz (FioCruz), INCQS 40051
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Tm	Cedida pela Fundação Oswaldo Cruz (FioCruz), INCQS 40004
<i>Microsporum canis</i>	Mc	Isolado clínico cedido pela Prof <sup>a</sup> Dra. Ana Marisa Fusco-Almeida

As linhagens fúngicas foram mantidas em estoque em ágar batata dextrose (BDA) e ágar Sabouraud à -20°C e glicerol a 10%. Para a realização dos experimentos foram descongeladas e repicadas para um tubo contendo ágar batata dextrose. Estas foram incubadas à 28°C e observadas diariamente durante 10 dias, com o objetivo de verificar a presença de crescimento das colônias e, assim, confirmar a viabilidade das cepas.

#### **4.4.1 Preparação do inóculo**

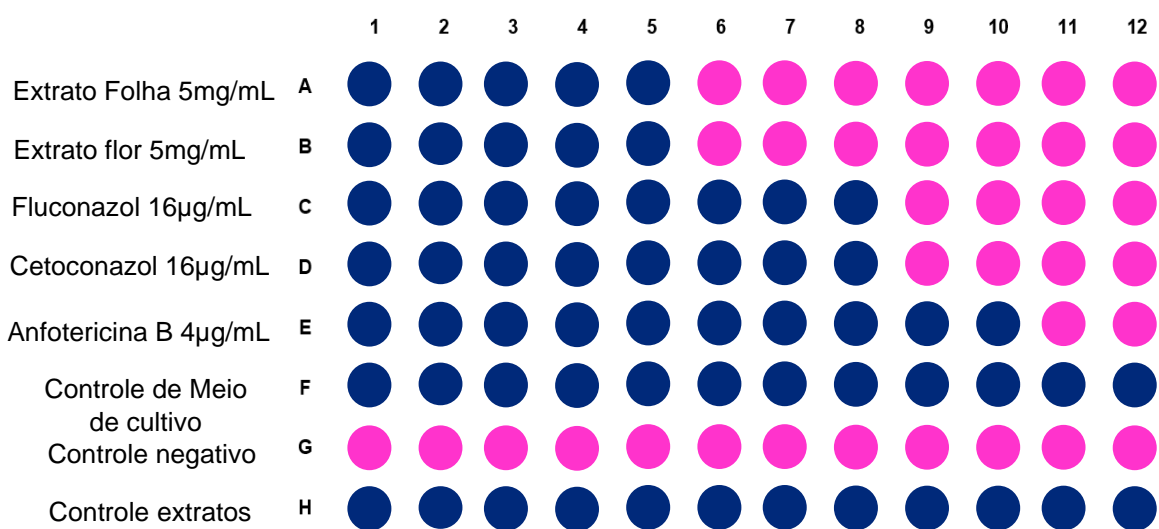
As linhagens foram desenvolvidas em placas com ágar Sabouraud ou ágar batata por 7 dias. Após o desenvolvimento raspou-se as colônias com auxílio de um fio de platina em L, colocando-as em tubo cônico contendo 5mL de salina estéril. Após este procedimento misturou-se em vortex por aproximadamente 3 minutos. As células foram contadas em câmara de Neubauer, ajustando o número de células para que se fosse obtido um número final de  $5,0 \times 10^4$  UFC/mL em meio RPMI.

#### **4.5 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e Fungicida Mínima (CFM) dos extratos de folhas e flores de *A. saturoioides***

A determinação do CIM foi baseada na metodologia do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M38-A3 (CLSI, 2017) com modificações, adaptada para microplacas de 96 poços e meio RPMI-1640 com 2% de glicose tamponado com ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico (MOPS) na concentração de 0,165 mol/L a pH 7,2.

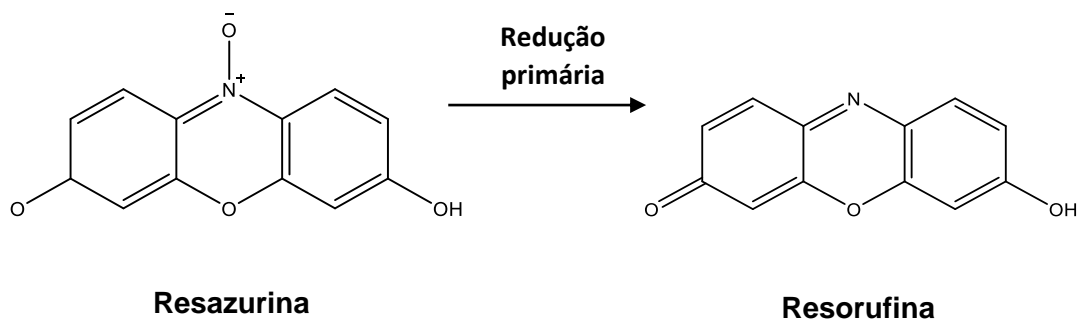
Os extratos brutos de *A. saturoioides* foram diluídos em DMSO atingindo uma concentração final de DMSO no máximo 1% para garantir a viabilidade das células fúngicas. Para este teste inicialmente foram adicionados 100 µL do RPMI-1640 suplementado em cada um dos poços, em seguida foram transferidos 100 µL dos extratos de *A. saturoioides* na concentração final de 5mg/mL, no primeiro poço de cada linha da microplaca. Foram também confeccionados poços de controle de antibiótico adicionando 100µL de cetoconazol (CTZ), fluconazol (FLZ), griseofulvina (GRS), miconazol (MCZ) e terbinafina (TER) e anfotericina B (ANFO B) em uma concentração de 64 µg/mL. Diluições seriadas de 100 µL foram realizadas e em seguida foram adicionados 100 µL da suspensão fúngica de Tr1, Tr1 FOC, Tm ou Mc previamente ajustada na concentração de  $5 \times 10^4$  UFC/mL a todos os poços da microplaca com exceção do poço destinado ao controle do meio de cultura (controle negativo). Como controle negativo foi confeccionado um poço contendo meio de cultura e suspensão fúngica.

Após a montagem a placa foi mantida por 7 dias a 28°C em estufa a 150 rpm. Após a incubação foi realizada a leitura visual para determinações da CIM. A CIM foi determinada pela concentração do último poço onde ocorreu inibição do crescimento. O crescimento fúngico foi também evidenciado pela adição de resazurina a 0,01% onde foi observado mudança de cor do meio de azul (inibição do crescimento) para rosa como se observa na Figura 6:



**Figura 6.** Esquema da placa para determinação da CIM

A resazurina (7-hidroxi-3H-phenoxazin-3-ona10-óxido) é um reagente de óxido-redução que indica atividade metabólica e proliferação de células vivas. O mecanismo baseia-se na redução da resazurina (forma oxidada, cor azul e não fluorescente) em resorufina (forma reduzida, cor rósea, fluorescente) (Figura 6). Ainda a resorufina sofre nova redução e é transformada em didiroresorufina, incolor e não fluorescente. A resazurina tem correlação direta com a quantidade/proliferação de células vivas, que incluem células bacterianas e até células de mamíferos (O'BRIEN et al., 2000) onde a cor azul representa células mortas e a cor rosa, células vivas.



**Figura 7.** Reação de redução da resazurina a resorufina e diidroresorufina  
Fonte:(O'BRIEN et al., 2000).

Cabe ressaltar que antes da leitura com resazurina foi coletada de cada poço uma amostra e inoculado em placa de Petri contendo meio BDA, com o auxílio de um palito de madeira estéril. A placa de Petri foi mantida em estufa a 28°C por 5 dias, para a leitura visual de inibição de crescimento e determinação da concentração fungicida mínima (CFM) que é a menor concentração onde não ocorreu crescimento celular.

#### 4.6 Avaliação da Atividade antioxidante

##### 4.6.1 Avaliação da atividade antioxidante pela captura do radical livre DPPH<sup>•</sup>

Uma solução 0,06 mM de DPPH<sup>•</sup>, foi preparada dissolvendo 2,4 mg de 2,2-difenil-1-picril-hidrazila em 100mL de metanol e transferida para um frasco de vidro âmbar. Em seguida se preparam soluções mãe com metanol dos extratos de folhas e flores de *A. saturoioides* a 100 µg/mL e dos padrões de ácido ascórbico, rutina, quercetina e ácido gálico a 50 µg/mL. Para a preparação da curva, foram realizadas em triplicata diferentes diluições para cada amostra (Extratos ou padrões) usando as quantidades como se indica na Tabela 4. O volume adicionado de DPPH<sup>•</sup> 0,06 mM em cada um dos tubos (A-K) foi de 2500 µL.

**Tabela 4.** Quantidades usadas no preparo de soluções para a determinação de atividade antioxidante pela liberação do radical DPPH<sup>•</sup>

Soluções	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	OK
Amostra (µL)	0	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
H <sub>2</sub> O (µL)	1000	900	800	700	600	500	400	300	200	100	0

Uma vez preparadas as soluções os tubos foram homogeneizados em agitador e mantidos na ausência de luz por 30 minutos. Após o período de incubação as absorvâncias de todos os tubos foram medidas a 515 nm, utilizando metanol como branco. O procedimento completo foi realizado em triplicata (BLOIS, 1958; BRACA et al., 2002; BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). Finalmente, após as medições, foram realizados gráficos de regressão da concentração da amostra vs a porcentagem de inibição do radical DPPH<sup>•</sup>, onde a

coeficiente angular da reta corresponde ao valor da concentração efetiva EC, com a qual se diminui 50% do valor inicial de DPPH (OLIVEIRA, 2015; RUFINO et al., 2007b).

#### 4.6.2 Avaliação da atividade antioxidante total pelo cátion radicalar ABTS<sup>•+</sup>

Uma solução do cátion radicalar ABTS<sup>•+</sup> foi preparada a partir da reação de 5 mL da solução estoque de ABTS com 88 µL da solução de persulfato de potássio (concentração). A mistura foi mantida no escuro, à temperatura ambiente, por 16 horas. Em seguida foi diluído 1 mL desta mistura em metanol até obter uma absorbância de 0,70 nm ± 0,05 nm a 734 nm (RUFINO et al., 2007a). Em seguida foram preparadas soluções-mãe, contendo etanol, dos extratos de folhas a 300 µg/mL e flores a 50 µg/mL e dos padrões de ácido ascórbico a 300 µg/mL, rutina 1500 µg/mL, quercetina a 300 µg/mL e ácido gálico a 100 µg/mL. Para a preparação da curva, foram realizadas em triplicata diferentes diluições para cada amostra (extratos ou padrões) usando as quantidades como se indica na Tabela 5. O volume adicionado da solução do cátion radical de ABTS<sup>•+</sup> em cada um dos tubos (A-K) foi de 3 mL.

**Tabela 5.** Quantidades usadas no preparo de soluções para a determinação de atividade antioxidante pela liberação do cátion radical ABTS<sup>•+</sup>

Soluções	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
Amostra (µL)	0	5	7	10	12	15	17	20	22	25	30
Etanol (µL)	30	25	23	20	18	15	13	10	8	5	0

O desaparecimento do cátion radical ABTS<sup>•+</sup> em cada um dos tubos foi determinado realizando a leitura da absorbância a 734 nm e 30° C, exatamente 6 minutos após o início da reação. O procedimento completo foi realizado em triplicata. Após as medições, foram realizados gráficos de regressão da concentração da amostra Vs a porcentagem de inibição do cátion radical ABTS<sup>•+</sup>, onde o coeficiente angular da reta corresponde ao valor da concentração efetiva EC, com a qual se diminui o 50% do valor inicial de ABTS (KARAKAYA; YILMAZ, 2007; RUFINO et al., 2007a).

#### **4.7 Avaliação da Citotoxicidade “*in vitro*”**

Foram utilizadas as linhagens de queratinócitos de pele (HaCat), células epiteliais de pulmão (A549) e células de carcinoma hepático HepG2 (ATCC HB 8065), que foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro e cultivadas em garrafas próprias com meio DMEM enriquecido com 10% de soro fetal bovino. As garrafas foram incubadas à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> até atingir confluência celular. Posteriormente, as células foram retiradas com o auxílio de PBS+EDTA, centrifugadas e ressuspensas no meio de cultura e contadas na câmara de Neubauer, de forma a obter uma concentração de  $1 \times 10^4$  células por poço da placa de microdiluição. Duzentos microlitros das suspensões de células foram semeados em cada poço de uma placa de 96 poços, a qual foi incubada por 24 h à 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> para permitir a adesão celular, obtendo pelo menos 80% de confluência. Foi feita a diluição seriada dos extratos em tubos cônicos, o meio anterior dos poços foi retirado e adicionadas aos poços os extratos de folhas e flores de *A. satureioides* em concentrações que variaram de 5000 – 2,441 µg/mL. As células foram expostas aos compostos por 24 h se adicionou 20 µL de resazurina a 60 uM (Sigma) e foram incubados por mais 8h. Após a incubação, a absorbância foi lida em leitor de microplacas (Biotek) em 570 e 600 nm e a concentração inibitória 50% (IC<sub>50</sub>) foi determinada pelo software GraphPad Prism 5.0 (COSTA-ORLANDI et al., 2021; XIAO et al., 2010).

#### **4.8 Avaliação do mecanismo de ação dos extratos de *A. satureioides* frente os dermatófitos**

##### **4.8.1 Quantificação do Ergosterol**

A quantificação de ergosterol foi realizada pelo método de Arthington-Skaggs et al. (2002). As células das quatro cepas de dermatófitos foram incubadas em caldo Sabouraud por 7 dias e utilizadas na concentração de  $5,0 \times 10^3$  UFC/mL para inocular erlenmeyers contendo 20 mL de caldo Sabouraud. Após esse período foram adicionadas as amostras de extratos de folhas, flores e os antifúngicos cetoconazol (CTZ) e fluconazol (FLZ) nas concentrações descritas na Tabela 6. Controles foram realizados com o inóculo das diferentes cepas sem adição de nenhuma amostra. Os erlenmeyers foram incubados por um período de

7 dias a 28 °C sob agitação a 120 rpm. Na tabela 6 se apresentam as concentrações das amostras vegetais e antifúngicos para o ensaio de quantificação de ergosterol (ARTHINGTON-SKAGGS et al., 2002).

**Tabela 6.** Concentração das amostras vegetais e antifúngicos para o ensaio de quantificação de ergosterol.

<b>Amostras</b>	<b>Tr1 (µg/mL)</b>	<b>Tr1 FOC (µg/mL)</b>	<b>Tm (µg/mL)</b>	<b>Mc (µg/mL)</b>
Extrato Folhas	312,50	625,00	312,50	312,50
Extrato Flor	625,00	625,00	625,00	312,50
CTZ	2,00	16	16,00	16,00
FLZ	1	16	32,00	16,00

CTZ: cetoconazol; FLZ: fluconazol

Posteriormente, as culturas foram colocadas em tubos de centrífuga, e centrifugadas a 3000 rpm por 5 min e lavadas com água destilada. Determinou-se o peso do precipitado e então adicionou-se 3 mL de solução de KOH a 25% (25% KOH, 35% água destilada e volume completo para 100% com etanol), agitando em vortex por 1 min para saponificação da membrana celular. As suspensões foram transferidas para tubos estéreis de boro-silicato com tampa e colocadas em banho-maria por 1 h a 90 °C. Após resfriamento a temperatura ambiente, os esteróis foram extraídos com a adição de 1 mL de água estéril e 3 mL de hexano e agitação em vortex por 3 min. A mistura foi deixada em repouso por 72 h a -20 °C para separação da camada de hexano, realizando-se a leitura com uma solução 1:5 da camada hexânica em etanol, utilizando espectrofotômetro e cubetas de quartzo de 1 cm na faixa de comprimento de onda de 300 a 220 nm.

A presença de ergosterol e de seu último intermediário (lanosterol) fornece um espectro com quatro bandas, sendo que a altura deles é correspondente à concentração dos esteróis. A concentração dos mesmos é calculada com base no peso das células iniciais e absorbâncias obtidas (ARTHINGTON-SKAGGS et al., 2002).

O conteúdo de ergosterol foi calculado como porcentagem em relação ao peso do precipitado (pellet), de acordo com as equações:

$$(1)\%ergosterol + \%24(28)DHE = \frac{\left[\left(\frac{A_{281,5}}{290}\right) x F\right]}{\text{Peso do pellet}}$$

$$(2)\%24(28)DHE = \frac{\left[\left(\frac{A_{230}}{518}\right) x F\right]}{\text{Peso do pellet}}$$

$$(3)\%ergosterol = (1) - (2)$$

Onde,

F= fator de diluição em etanol

290= valor E, em porcentagem por cm, determinado para o ergosterol cristalino.

518=valor E, em porcentagem por cm, determinado para o 24(28) DHE cristalino.

#### 4.8.2 Ligação ao ergosterol exógeno

Esta metodologia foi desenvolvida da mesma forma que a determinação de CIM pela Norma M27-A2, entretanto, com adição de 200 µg/mL de ergosterol comercial dissolvido em dimetilformamida e diluído em meio de cultura de forma que a concentração final da solução não fosse superior de 0,1%. Foram testados os extratos de *A. satureioides* (folhas e flor) e os controles CTZ, FLZ e ANFO B nas mesmas concentrações utilizadas para determinação de CIM em concentrações 4 vezes maior. A incubação das microplacas foi de 7 dias a 35 °C, sem agitação. A concentração inibitória mínima foi determinada visualmente pela ausência de turvação e pela manutenção da coloração rósea do meio de cultura.

#### 4.8.3 Efeito de proteção do sorbitol

Esta metodologia foi desenvolvida de acordo com a determinação de CIM pela Norma CLSI M27-A3, entretanto, com adição de 0,8 M de sorbitol. Foram testados os extratos de folhas e flores de *A. satureioides* e os controles com CTZ, FLZ e ANFO B nas mesmas concentrações utilizadas para determinação de CIM, no entanto, os extratos de *A. satureioides* (folhas e flor) em concentração 4 vezes maior. A incubação das microplacas foi de 7 dias a 35 °C, sem agitação (ESCALANTE et al., 2008). A concentração inibitória mínima foi determinada

visivelmente pela ausência de turvação e pela manutenção da coloração rósea do meio de cultura. Os testes foram realizados em triplicata.

#### **4.8.4 Estudo da integridade da parede celular e da presença de lipídeos neutros nos dermatófitos por microscopia confocal**

Através deste ensaio se avaliou os danos à parede celular das hifas e a presença de lipídeos neutros nos dermatófitos utilizando os fluorocromos Calcofluor White (CW) e o corante Vermelho do Nilo (VN) respectivamente. As cepas foram tratadas com extratos de folhas e flores de *A. saturoioides* e o antifúngico fluconazol.

Os ensaios foram realizados em placas de 24 poços, sob lamínulas de vidro estéreis. Se adicionaram os extratos em concentrações que variavam entre 2500 - 78,125 µg/mL e entre 64 - 2 µg/mL para o fluconazol, através de diluição seriada. Também foi considerado um poço como controle positivo (culturas tratadas com DMSO 2% e outro como controle negativo, ou seja, sem tratamento (meio de cultura + células fúngicas). Finalmente foram adicionados 500µL das suspensões fúngicas em uma concentração de  $5 \times 10^4$  UFC/mL e se deixaram em incubação a 28°C, durante 7 dias sob agitação.

Após esse período as placas foram centrifugadas (500 rpm; 10 mins; 25°C) para retirar o sobrenadante e lavadas uma vez com PBS. Em seguida, foram adicionados 1 mL de paraformaldeído a 4% em cada um dos poços e se deixaram em incubação a 4 °C overnight. Transcorrido esse tempo, em uma das placas foi adicionado 1mL de uma solução de CW a uma concentração de 100 mg/mL. As placas foram incubadas por 40 minutos a temperatura ambiente ao abrigo de luz. Transcorrido o tempo, as placas foram lavadas duas vezes com PBS. Para as culturas tratadas com VN, se levou a cabo o mesmo processo que com as placas tratadas com calcofluor, porém o tempo de incubação foi apenas 5 minutos. Finalmente, as leituras foram realizadas no Microscópio de Fluorescência Confocal (Carl Zeiss LSM 800 com Airyscan, pertencente a Faculdade de Odontologia do Campus de Araraquara (FOAr)/UNESP (BILA et al., 2021).

## **4.9 Preparação de Sistemas de liberação**

### **4.9.1 Preparação de micropartículas de quercetina e ácido 5-O-cafeoilquínico por Spray-drying**

Para a obtenção das micropartículas por spray-drying, inicialmente foi preparada uma solução com quitosana 0,5% (p/v) em de ácido acético 1% (v/v). A solução permaneceu sob agitação a 300 rpm em abrigo de luz durante 24h. A esta dispersão, foram adicionados uma massa de quercetina (QR1) e ácido 5-O-cafeoilquínico (AC2) equivalente a 30% do peso seco de quitosana e 1% de Soluplus® (copolímero de polivinil caprolactama-polivinil acetato-polietilenoglicol). A dispersão do quitosana [0,5% (p/v)] com quercetina ou ácido 5-O-cafeoilquínico foi atomizada no Mini Spray Dryer BUCHI-290. Os seguintes parâmetros foram programados no equipamento: temperatura de entrada de ar, 180°C; fluxo da bomba, 10%; fluxo de ar atomizado, 450 NL/h; eficiência do aspirador, 90%; e temperatura de saída de ar, 80°C. Finalmente o pó foi coletado em um frasco previamente pesado para calcular a porcentagem de rendimento do método (SPAGNOL et al., 2018).

Foram preparadas outras micropartículas com quercetina (QR3) e de ácido 5-O-cafeoilquínico (AC4) usando a mesma metodologia descrita anteriormente, no entanto, foi substituído o soluplus® por 1% de tween® 80.

#### **4.9.1.1 Caracterização de micropartículas por microscopia eletrônica de varredura**

A morfologia das micropartículas foi analisada utilizando fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MALLIKARJUNA et al., 2005). As amostras foram cobertas com uma fina camada de ouro fotomicrografado a 10.000 vezes de aumento com um feixe de elétron de 2,0 kV usando o microscópio eletrônico de varredura de alta resolução S-4800 (Número de série: HI-9269-0009).

#### **4.9.2 Preparação de micelas poliméricas por hidratação de películas finas contendo quercetina e ácido 5-O- cafeoilquínico**

As micelas poliméricas de QR e AC foram preparadas pelo método de película fina (CAGEL et al., 2017; KESHARWANI et al., 2019; ZHANG et al., 2014). Em resumo, 250 mg de Soluplus®, e 0,55 mg de quercetina ou ácido 5-O-cafeoilquínico foram dissolvidos em 20 mL de uma mistura EtOH/H<sub>2</sub>O (70:30 v/v). Em seguida, os solventes foram evaporados no rotaevaporador a 30°C e 250 psi de pressão, até a formação de uma película fina. Finalmente, o filme foi hidratado com 5 mL de água destilada e deixado em sonicação durante 5 min seguidos. Após esse período a solução foi deixada durante 20 min mais sob agitação magnética a 200 rpm.

#### **4.9.3 Determinação da CIM e CFM das formulações**

Foi realizado o mesmo procedimento descrito no item 4.5, porém a concentração final usada para todas as formulações no primeiro poço foi de 2,5mg/mL. Também foram destinados poços correspondentes ao controle do meio de cultura (controle negativo) e como controle positivo foi confeccionado um poço contendo meio de cultura e suspensão fúngica.

#### **4.10 Identificação das substâncias por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas**

Os ensaios de identificação dos flavonoides e os produtos presentes nos extratos hidroalcoólicos de folhas e flores de *A. saturoioides* foram realizados por UPLC-QTOF-MS/MS de alta resolução na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Fortaleza/CE, em colaboração com o Dr. Guilherme Julião Zucolo, utilizando o cromatógrafo Acquity UPLC Waters® acoplado a quadrupole/time of flight system (XEVO-QToF, Waters®), equipado com coluna BEH C18 Waters® (150 x 2.1 mm; 1.7 µm); modo gradiente linear de 30% de MeCN (ácido fórmico 0,1%) (v/v) para 90% de MeCN (ácido fórmico 0,1%) (v/v) em 30 min, vazão 0,25 mL/min, volume de injeção 5 µL. Os parâmetros de operação utilizados na fonte de ionização ESI foram: voltagem do capilar: 2,6 kV, voltagem do cone: 0.5 V, temperatura da fonte ESI (modo positivo): 120 °C, temperatura de dessolvatação do gás: 350 °C, vazão do gás de dessolvatação:

500 L/h. A faixa de massas usada no modo de análise full-scan foi de 300 a 700 unidades de massa ( $m/z$ ). O programa MassLynx (Waters® Corporation) foi usado para controle do equipamento, aquisição e análise de dados (BUENO et al., 2015; ODA et al., 2019).

#### 4.11 Desenvolvimento e validação dos métodos analíticos para a quantificação de quercetina e ácido 5-O- cafeoilquínico nos extratos de folhas e flores e nos sistemas de liberação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Para a validação dos métodos analíticos, para a quantificação de QR e AC nos extratos (Validação 1) foi utilizada a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) ANVISA nº 166 de 2017 e a ..RDC nº 27 de 2012, que dispõem sobre os requisitos mínimos para a validação desses métodos (BRASIL, 2012, 2017), sendo que para isso foi usado o cromatógrafo 1.

Por outro lado, na quantificação de QR e AC nos sistemas de liberação (Validação 2) foram consideradas as especificações da Conferência Internacional sobre Harmonização (ICH) (ICH, 2016). Para isso as análises foram realizadas no cromatógrafo 2.

Na Tabela 7, estão representados os parâmetros que foram avaliados para cada uma das validações e os valores das concentrações das curvas de calibração.

**Tabela 7.** Parâmetros avaliados na validação 1 e 2 para a quantificação de QR e AC por HPLC

Validação	Efeito residual	Parâmetros				Robustez
		Linearidade	Precisão e exatidão	Limite de detecção (LD)	Limite de quantificação (LQ)	
1	X	X	X	X	X	-----
2	-----	X	X	X	X	X

#### 4.11.1 Condições Cromatográficas

Na Tabela 8, estão representadas as condições cromatográficas dos métodos isocráticos utilizados para a validação 1 e 2 para a quantificação de QR e AC nos extratos e nos sistemas de liberação respectivamente.

**Tabela 8.** Condições cromatográficas utilizadas nas validações dos métodos

Condição	Validação 1	Validação 2
Tipo de Coluna	C18 NTS (250 × 4,6 mm, 5,0 µm)	C18 Phenomenex (250 × 4,6 mm, 5,0 µm).
Temperatura (°C)	25	25
Fase móvel	Acetonitrila e água acidificada com ácido acético 1% (30:70)	Acetonitrila e água ajustada a pH: 4,5 com ácido fosfórico (40:60)
Vazão (mL/min)	1,0	0,7
Volume de injeção (µL)	20	10
Detectores (nm)	QR: 256 AC: 330	QR: 256 AC: 330
Tempo de corrida (mins)	15	10

#### 4.11.2 Preparo das soluções padrão

As soluções de estoque (1000 µg/mL) de QR e AC foram diluídas em metanol 80% e metanol 50% respectivamente. A partir de uma solução de trabalho de 500 µg/mL, se construíram as curvas analíticas da validação 1 e 2. Para a primeira validação se prepararam curvas analíticas em concentrações de 12,5; 25; 50; 75; 100, 150 e 200 µg/mL e para a validação 2, foi preparada uma curva analítica usando as concentrações de 0,0195; 0,0391; 0,0781; 0,15625; 0,3125; 0,625 1,25; 2,5; 5; 10; 25; 50; 100; 200; 300; 400 e 500 µg/mL a partir de diluição seriada. Todas as soluções foram filtradas em filtro de seringa de politetrafluoretileno (PTFE) (0,22 µm, 13 mm) e colocados em vials para análise no sistema cromatográfico HPLC.

### **4.11.3 Desenvolvimento do método**

A fim de avaliar o perfil da quercetina e o 5-O- cafeoilquínico nos extratos de flores e folhas respectivamente, foi realizada uma análise preliminar utilizando um gradiente exploratório iniciando com 5% de fase B (acetonitrila) e 95% de fase A (água acidificada com 1% de ácido acético), até atingir 100% de fase B em um período de 60 minutos.

A partir dos cromatogramas obtidos, foram realizadas alterações no gradiente cromatográfico com o objetivo de escolher aquele que for mais adequado para a análise dos extratos de folhas e flores. Entre as concentrações testadas foi visto que o gradiente adequado para a validação 1 foi: 30% de fase B e 70% de fase A, durante 15 minutos, os cromatogramas estão apresentados no Apêndice I. Para a validação 2, se realizaram pequenos ajustes encontrando-se que o gradiente de eluição adequado foi: 40% de fase B e 60% de fase A, durante 10 minutos.

### **4.11.4 Parâmetros de validação**

#### **4.11.4.1 Efeito residual**

O efeito residual (carryover) foi avaliado pela injeção de três amostras brancas, uma antes e duas depois da injeção de uma amostra processada do LQ (1,25 µg/mL). Admitiu-se como aceitável a resposta de interferentes nos mesmos tempos de retenção para os analitos e o padrão interno de até 20% e 5%, respectivamente, em comparação com amostras analisadas do LQ.

#### **4.11.4.2 Precisão**

A precisão da validação 1, foi avaliada através do coeficiente de variação (CV%), calculado pelo desvio padrão das triplicatas pela concentração média determinada. As amostras foram avaliadas em uma única corrida analítica (intra-corrída) e em três dias consecutivos (inter-corrída), mantendo a mesma instrumentação, mesmo analista e as mesmas condições de operação. Foram utilizadas 3 concentrações diferentes: 12,5; 75 e 200 µg/mL. A variabilidade aceitável dos valores como o erro padrão relativo (EPR) e %CV foi de  $\pm 15$  nominal.

A precisão na validação 2, foi determinada por meio da repetibilidade, na qual, seis réplicas da solução de QR e AC na concentração de 100µg/mL foram analisadas no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais e pelo mesmo analista e o desvio padrão relativo (DPR) entre as análises foi calculado. Também foi calculada a precisão intermediária, por meio de análises entre diferentes analistas no mesmo dia, e o DPR foi calculado nas respostas obtidas para as seis réplicas da solução de QR e AC preparadas pelos diferentes analistas.

#### **4.11.4.3 Linearidade**

Para a validação 1 e 2, foram construídas as curvas analíticas em triplicata a partir da área do pico do analito contra concentração nominal do analito. A correlação linear entre as respectivas respostas e concentrações nominais foi avaliada por análise de regressão pelo método dos mínimos quadrados (equação da reta e coeficiente de correlação  $r$ ). Os critérios de aceitação da curva levaram em consideração os que tiveram coeficiente de correlação ( $r$ ) maior do que 0,99. Foi necessário aplicar modelo de ponderação  $1/y^2$ , o qual foi avaliado pela análise de variância ANOVA, calculando os valores de  $F$  e  $p$ , para um nível de confiança de 95% e graus de liberdade  $n-1$ . Os cálculos estatísticos foram realizados empregando os programas GraphPad Prism ® 5.

#### **4.11.4.4 Exatidão**

A exatidão, se determinou após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear do método, sendo verificada a partir de nove determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, três concentrações, baixa, média e alta, com três réplicas cada. A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (Equação 4).

$$Exatidão = \frac{Concentração\ Média\ Experimental \times 100}{Concentração\ Teórica} \quad (4)$$

#### 4.11.4.5 Robustez

A robustez do método foi avaliada através da alteração das condições cromatográficas estabelecidas. Soluções padrão de QR e AC a 100 µg/mL foram injetadas no HPLC com variação das seguintes variáveis:

- Comprimento de onda QR: 253 e 255 nm
- Comprimento de onda AC: 327 e 329 nm
- Taxa de fluxo da fase móvel: 0,80 e 1 mL/min.
- Volume de injeção: 10 e 30 µL.

Os resultados foram avaliados considerando a Desvio Padrão Relativo (RSD) O parâmetro que apresenta a maior variação nas medições deve ser controlado e monitorado durante a análise de rotina.

#### 4.11.4.6 Limite de detecção

O limite de detecção (LD) do QR e o AC foram determinados a partir das três curvas analíticas obtidas, utilizando-se os dados de desvio padrão do intercepto e inclinação média da curva analítica, conforme a Equação (5):

$$LD = \frac{DPa \times 3,3}{IC} \quad (5)$$

Em que:

DPa= desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, três curvas analíticas.

IC= inclinação da curva analítica.

#### 4.11.4.7 Limite de quantificação

O limite de quantificação foi obtido de com base nos mesmos dados descritos, segundo a Equação (6), como se mostra a continuação:

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC} \quad (6)$$

DPa= desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, três curvas analítica.

IC= inclinação da curva analítica.

#### 4.12 Tape stripping

Para este ensaio foi realizado utilizando amostras de pele humana abdominal obtidas a partir de correções cirúrgicas por aprovação da Pesquisa Comitê de Ética da Universitat de Valencia, Espanha, sob o Número do protocolo: H1462978691586. O excesso de gordura e tecidos conjuntivos foram removidos, e as amostras armazenadas em um freezer a 26 °C por menos de três meses. A pele foi colocada sobre uma lâmina de vidro com o exterior voltado para cima e uma fita de alumínio foi colocado sobre ele, deixando a área de aplicação descoberta. Foram adicionadas as 0,5 mL das formulações de contendo micropartículas Tween® 80 com QR e AC, micropartículas com soluplus e QR ou AC e micelas com QR ou AC. As micropartículas foram dissolvidas em etanol: água (70:30) e as micelas foram adicionadas sobre a pele de forma direta. A partir daí o sistema foi incubado a 32 °C durante duas horas e seis horas.

A técnica tape stripping é caracterizada por ser minimamente invasiva onde o SC é removido após aplicações sequenciais de fitas adesivas, permitindo a quantificação do ativo presente na primeira camada da pele (CARON et al., 1990; PINKUS, 1951). As tiras de fita adesiva removidas não têm informações sobre a quantidade de corneócitos e as substâncias penetradas, mas sim pode dar uma ideia sobre a distribuição das substâncias nas diferentes profundidades do SC (BALEEIRO et al., 2013; CAROLINA OLIVEIRA DOS SANTOS et al., 2019).

Para este teste foram usadas 25 fitas adesivas que foram as necessárias para completar remoção do estrato córneo. As fitas foram retiradas e agrupadas como se observa na Tabela 9:

**Tabela 9.** Agrupação de fitas para cada strip

Fita(s)	Número de Strip (S)
1	S1
2	S2

3-5	S3
6-10	S4
11-15	S5
16-20	S6
21-25	S7

---

As primeiras 15 fitas permitiram obter aproximadamente 90% da concentração do ativo presente nessa camada, de modo que as fitas subsequentes podem representar em menos de 5% (BALEEIRO et al., 2013; CARON et al., 1990; ESCOBAR-CHAVEZ et al., 2008; PINKUS, 1951).

As fitas contendo QR ou AC foram transferidas a frascos de vidro e posteriormente foram extraídos os ativos com uma solução de metanol: água (50:50, v/v) sob agitação por um período de 24 h e posteriormente quantificada por HPLC através do método validado descrito anteriormente. Os dados da fita adesiva representaram a distribuição dos ativos dentro do SC e dá uma visão do gradiente de concentração de QR e AC através desta camada, que é a barreira limitante para a difusão de drogas. Os experimentos foram realizados em quadruplicada.

#### **4.13 Análise estatística**

Os testes foram realizados em triplicatas e os resultados apresentam-se como a média dos valores obtidos  $\pm$  desvio-padrão (exceto o teste de determinação da concentração inibitória e fungicida mínimas, cujo resultado é expresso pela moda dos valores obtidos). Quando necessário foi realizada análise de variância (ANOVA) e aplicado o teste de Tukey ou de Dunnet de comparação de médias. Para análise estatística, considerou-se como significativo valor de  $P < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos de *A. saturoioides*

Na Tabela 10 estão apresentados os resultados obtidos da CIM e CFM dos extratos de folhas e flores de *A. saturoioides* frente as diferentes cepas dermatofíticas. Na tabela também estão representados os valores correspondentes aos controles positivos dos fármacos antifúngicos: caspofungina (CAS), cetoconazol (CTZ), fluconazol (FLZ), griseofulvina (GRS), miconazol (MCZ), terbinafina (TER) e anfotericina B (ANFO B).

**Tabela 10.** Valores de CIM e CFM das amostras vegetais e os fármacos antifúngicos

Concentração Inibitória Mínima CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )									
Microrganismo <sup>a)</sup>	Extrato Folha	Extrato flor	CAS	CTZ	FLZ	GRS	MCZ	TER	ANFO B
Tr1	312,5	625	16	2	1	0,250	0,125	0,031	1,5
Mc	312,5	312,5	1	16	16	0,500	0,125	0,062	4
Tr1 FOC	625	625	16	16	16	0,500	1	0,250	4
Tm	625	625	16	16	32	0,500	0,250	0,031	4
Concentração Fungicida Mínima CFM ( $\mu\text{g/mL}$ )									
Microrganismo <sup>a)</sup>	Extrato Folha	Extrato flor		CTZ	FLZ	GRS	MCZ	TER	ANFO B
Tr1	312,5	625	32	4	1	0,250	0,125	0,031	1,5
Mc	312,5	625	4	32	32	1	0,125	0,062	4
Tr1 FOC	625	625	16	32	32	1	1	0,250	4
Tm	625	625	16	16	32	0,500	0,250	0,031	4

<sup>a)</sup> Microrganismo: Tr1: *T. rubrum* isolado clínico; Mc: *M. canis*; Tr1 FOC: *T. rubrum* Fundação Osvaldo Cruz; Tm: *T. mentagrophytes*. Antifúngicos: caspofungina (CAS), cetoconazol (CTZ), fluconazol (FLZ), griseofulvina (GRS), miconazol (MCZ), terbinafina (TER) e anfotericina B (ANFO B).

Os resultados revelaram que os extratos de folhas e flores podem atuar como agentes fungistáticos e fungicidas, ou seja, que são capazes de inibir o crescimento e eliminar as células de todas as linhagens fúngicas. Como se observa na Tabela 10, o extrato de folhas demonstrou ter melhor potencial antifúngico frente à cepa *T. rubrum* já que apresentou CIM e CFM de 312,5  $\mu\text{g/mL}$ . Por outro lado, pode ser observado que ambos extrativos apresentaram as menores CIM (312,5  $\mu\text{g/mL}$ ) para inibir o crescimento da cepa de *M. canis*.

Cabe ressaltar que durante os experimentos foi considerado também um controle positivo da solução 1% de DMSO:RPMI (1:5; v/v), pois este foi o solvente utilizado para solubilizar os extratos vegetais. Os resultados não mostraram nenhuma interferência no crescimento das espécies dermatofíticas, portanto também nos valores de CIM e CFM obtidos.

Os resultados forneceram algumas evidências das propriedades biológicas dos extratos brutos e seus compostos fitoquímicos contra os dermatófitos, abrindo a possibilidade de que estes possam ser usados como precursores para o desenvolvimento de moléculas ou substâncias eficazes como antifúngicos (ARIF et al., 2009; NEGRI et al., 2014).

Investigações sobre a composição química de *A. saturoioides* tem demonstrado que os extratos obtidos a partir de inflorescências são ricos em derivados de fenilpropanoides e ácido quínico assim como também flavonoides, como luteolina, quercetina, isoquercetina, 3-O-metil-quercetina e acyrobichalcona compostos que são conhecidos por ter efeitos como antioxidantes e antimicrobianos (FERRARO et al., 2008; GRASSI-ZAMPIERON et al., 2010a; MARTINEZ-ROSSI et al., 2018a; SOUZA et al., 2018; WANG et al., 2021).

Desta forma é possível deduzir que a presença destes compostos nos extratos de *A. saturoioides* podem estar relacionados com a atividade antifúngica encontrada. Estudos relatam que flavonoides como a isoquercetina atuam causando danos diretos na membrana celular fúngica (LEE; LEE, 2014; YUN et al., 2015) e algumas chalconas são capazes de agir diretamente no desenvolvimento de hifas (TEODORO et al., 2015). Além disso, estudos tem demonstrado que este tipo de flavonoides apresenta atividade antifúngica contra dermatófitos através da inibição da biossíntese da parede celular (BOECK et al., 2005), e o bloqueio da FAS, a enzima ácido graxo sintase (*fatty acid synthase*) (BITENCOURT et al., 2013).

Por outro lado, também tem sido evidenciado que compostos fenólicos (fenóis e polifenóis) podem exercer atividade em diferentes vias e alvos celulares, que afetam a integridade celular. Esse é o caso dos derivados do ácido caféico,

que apresentam atividade antifúngica contra cepas *T. rubrum*, parecendo que seu modo de ação pode estar relacionado à inibição de ergosterol, prejudicando a membrana celular, juntamente com uma moderada inibição da atividade de Liase isocitrato (CANTELLI et al., 2017).

Assim também a quercetina e a luteolina presentes nos extratos de *A. saturoioides*, tem mostrado atividade contra a cepa *T. rubrum*, indicando que o modo de ação destes pode estar relacionado à inibição do ergosterol, danos à membrana e à inibição da atividade da FAS (BITENCOURT et al., 2013).

Quanto aos valores de CIM e CFM dos controles positivos de cetoconazol, fluconazol, griseofulvina, miconazol, terbinafina e anfotericina B, demonstraram estar dentro dos limites recomendados pela Norma (CLSI) M38-A3 (CLSI, 2017) que estabelece os parâmetros de análise para os ensaios de microdiluição durante 7 dias para cepas dermatofíticas.

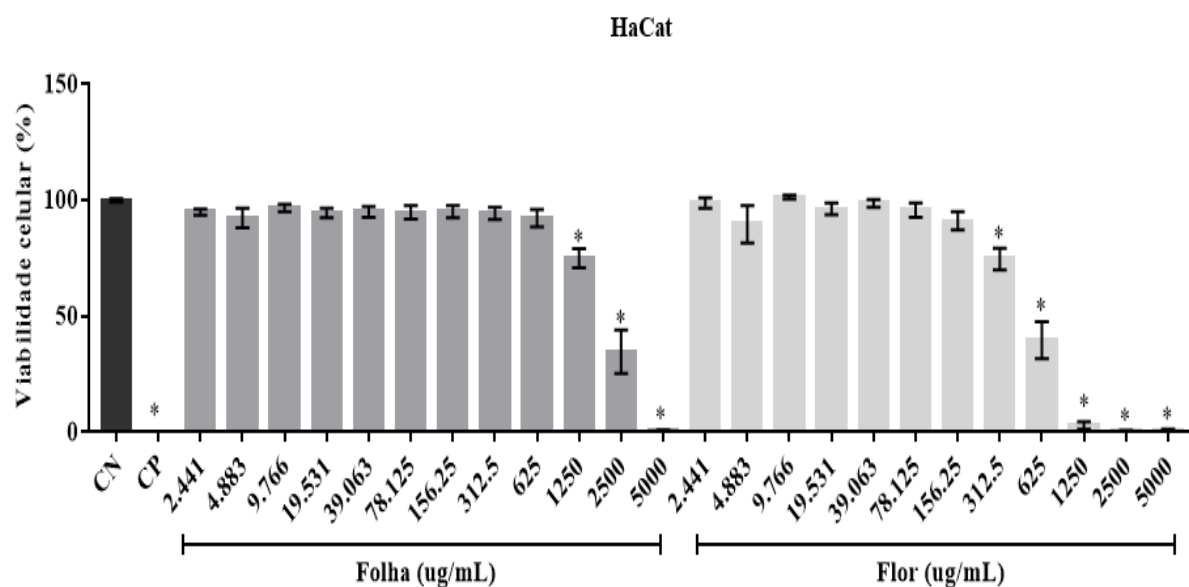
De acordo com nossos resultados pode-se deduzir que todos os antifúngicos agiram frente as células dermatofíticas por via de biossíntese de ergosterol. O cetoconazol, o miconazol e o fluconazol atuaram sobre as células fúngicas provavelmente através da inibição do citocromo P-450-3-A e da inativação da enzima C-14- $\alpha$ -demetilase. Esses antifúngicos são capazes de inibir a síntese do ergosterol na membrana celular, e como consequência disso e da acumulação de esteróis tóxicos intermediários, a permeabilidade da membrana aumenta, causando uma interrupção no crescimento do fungo (MARTINEZ-ROSSI et al., 2018b; VALDÉS, 2005).

A terbinafina e a anfotericina B, possivelmente atuaram frente os dermatófitos pela via de biossíntese de ergosterol, o primeiro pela acumulação de lanosterol e a anfotericina B por sua ligação direta ao ergosterol, reduzindo assim a integridade da membrana plasmática. Finalmente a ação da griseofulvina, foi evidente nos resultados e pode ter sido devido à capacidade deste antifúngico de impedir a formação de microtúbulos, prejudicando o crescimento fúngico e a divisão celular (MARTINEZ-ROSSI et al., 2018b).

Com base aos resultados obtidos foram analisados os perfis químicos dos extrativos (folhas e flores), para saber quais metabólitos estariam presentes e desta forma poder sugerir de forma mais específica o composto ou compostos responsáveis da atividade antifúngica encontrada. Além disto, outros ensaios foram realizados para poder estabelecer o possível mecanismo de ação dos extratos frente às células dermatofíticas.

## 5.2 Avaliação da citotoxicidade “*in vitro*”

Foi analisado o efeito de citotoxicidade dos extratos de folhas e flores de *A. saturoioides* pela análise da viabilidade celular frente à linhagem celular HaCat, correspondente uma linhagem não-tumoral de queratinócitos. Os resultados estão demonstrados na Figura 8.



**Figura 8.** Percentual de células HaCat viáveis tratadas com os extratos etanólicos de folhas e flores *A. saturoioides* após 24h de tratamento (n=4). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. CN: Controle negativo (células sem tratamento), CP: Controle positivo (Células tratadas com DMSO 50 %). Método estatístico utilizado ANOVA two-way com post hoc Tukey.

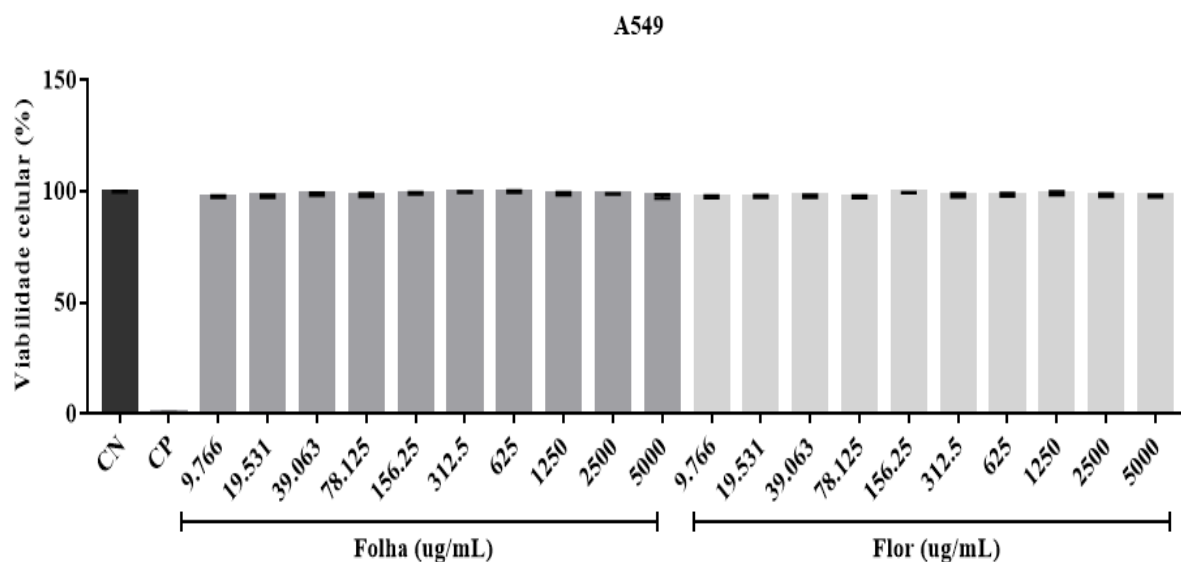
Os resultados da Figura 8 indicam que após 24 h, o extrato de folha de *A. saturoioides* nas concentrações de 5000, 2500 e 1250  $\mu\text{g/mL}$  diminuiu a viabilidade celular das células HaCat de 0,62, 34,67 e 75,09 %, respectivamente,

quando comparado com o controle negativo (100%). Da mesma forma, se observa que as células tratadas com o extrato de flores mostraram viabilidade de 0,95, 2,08, 3,16, 39,77 e 74,79 % nas concentrações de 5000, 2500, 1250, 625 e 312,5 µg/mL, respectivamente. A partir dos resultados obtidos, foi possível calcular o valor da Concentração inibitória IC<sub>50</sub> que promoviam a morte celular em 50% das células HaCat em função ao tempo de tratamento (24h). O valor de IC<sub>50</sub> obtido para o extrato de folha foi de 2064 µg/mL e para o extrato de flor 625 µg/mL.

Os resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade, sugerem que os extratos brutos em concentrações maiores a 1250 µg/mL para o extrato de folhas e 312,5 µg/mL para o extrato de flor podem afetar a viabilidade celular das células HaCat. Os diferentes níveis de citotoxicidade podem estar relacionados com os parâmetros bioquímicos das células envolvidas, como a composição da membrana do plasma e a atividade metabólica, o tempo de exposição ao agente tóxico, e o ensaio de toxicidade usado (ALVES et al., 2015; PAPO; SHAI, 2005). Cabe ressaltar também que a viabilidade celular nas concentrações obtidas de CIM para o extrato de folha (312,5-625 µg/mL), não afetaram a viabilidade das células HaCat, obtendo-se valores de quase 100%. Portanto, mais estudos devem ser realizados a fim de compreender a complexidade do mecanismo de ação, bem como a relação estrutura-atividade dos compostos ativos presentes nos extratos. Estes estudos devem envolver a caracterização molecular e a interação dos compostos químicos presentes nos extratos com os receptores de membrana celular.

Alguns estudos realizados sobre a citotoxicidade dos extratos aquosos e etanólicos de *A. saturoides* frente a células HaCat, tem demonstrado que em concentrações baixas (1 µg/mL-10 µg/mL), os extratos apresentam um efeito imunomodulador e anti-inflamatório (COSENTINO et al., 2008). Todas estas descobertas apoiam o uso tradicional da espécie para fins de cicatrização de feridas além de atuar em diferentes fases do processo de cura (DE SOUZA; BASSANI; SCHAPOVAL, 2007).

Com o intuito de verificar se os extratos vegetais poderiam apresentar ou não toxicidade sobre outras linhagens celulares, foi realizado o ensaio de citotoxicidade, usando células epiteliais de pulmão A549 e células de carcinoma hepático HepG2. Os resultados estão apresentados nas Figuras 9 e 10.



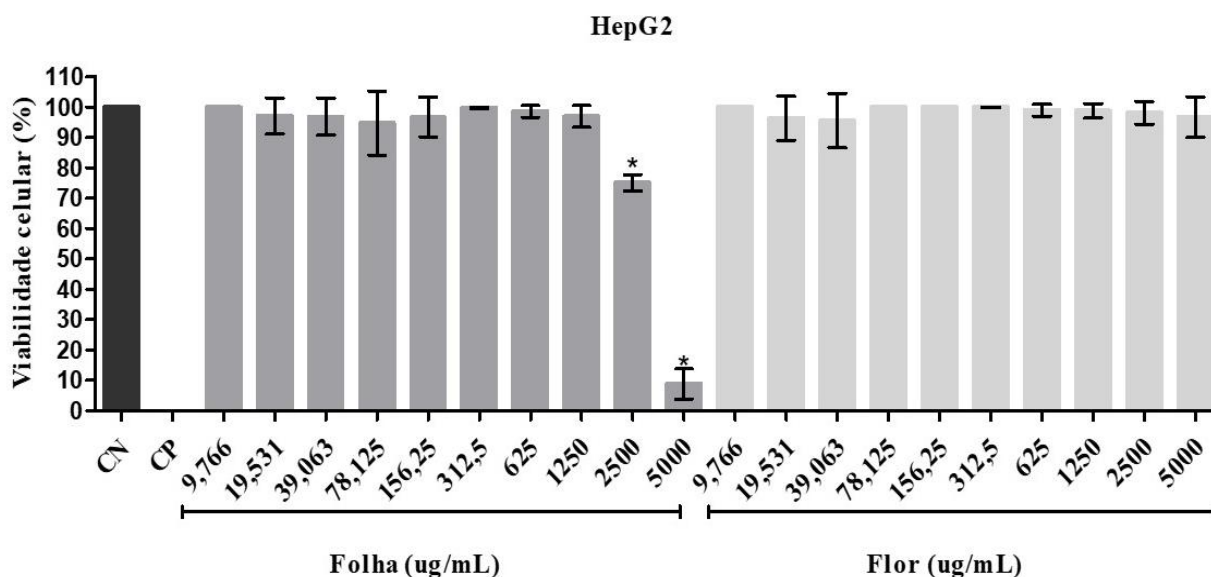
**Figura 9.** Percentual de células A549 viáveis tratadas com os extratos etanólicos de folhas e flores de *A. saturoioides* após 24h de tratamento (n=4). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. CN: Controle negativo (células sem tratamento), CP: Controle positivo (Células tratadas com DMSO 50%). Método estatístico utilizado ANOVA two-way

A Figura 9 representa a análise do percentual células A549 viáveis incubadas com os extratos de folhas e flores de *A. saturoioides*. Após 24h de tratamento, os resultados indicaram que ambos os extratos em todas as concentrações não conseguiram reduzir a viabilidade das células A549 quando comparado com a viabilidade das culturas tratadas com DMSO 50%.

De maneira semelhante ao observado com a linhagem A549, as células HepG2 tratadas com extrato de flor, não apresentaram diminuição significativa na porcentagem de viabilidade, quando comparado com o grupo controle. No entanto, com o extrato de folhas nas concentrações de 5000; 2500  $\mu\text{g/mL}$ , foi observada uma perda na porcentagem de viabilidade (75,10; 8,85 %) das células tratadas

com o extrato, quando comparado com as culturas tratadas com DMSO 50% (Controle positivo) evidenciando-se uma redução da viabilidade celular das células HepG2. O valor de IC<sub>50</sub> do extrato de folha foi de 3407 µg/mL.

Finalmente, como se observou nos resultados os extratos de folhas de *A. saturoioides*, aparentemente em concentrações maiores a 5000µg/mL, são



**Figura 10.** Percentual de células HepG2 viáveis tratadas com os extratos etanólicos de folhas e flores de *A. saturoioides* após 24h de tratamento (n=4). Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. CN: Controle negativo (células sem tratamento), CP: Controle positivo (Células tratadas com DMSO 50%). Método estatístico utilizado ANOVA two-way com post hoc Tukey.

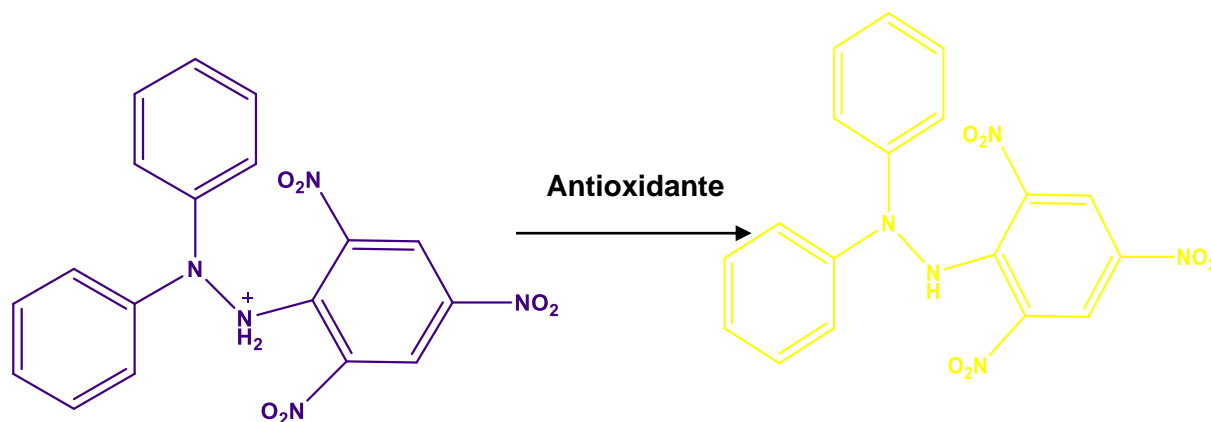
citotóxicos frente as células HepG2 (Figura 10).

Existem algumas evidências que descrevem que compostos como a quercetina, a luteolina e a 3-O-metil-quercetina apresentam potencial antitumoral. Estes flavonoides têm demonstrado uma alta capacidade de agir por diferentes mecanismos de ação e alvos moleculares, conseguindo dessa forma, a inibição da proliferação celular, a interrupção do ciclo celular, a morte celular por apoptose, a inibição de angiogênese e a prevenção da migração/metástase, tanto em forma de isolados ou em combinação com outros medicamentos antitumorais (CARINI; KLAMT; BASSANI, 2014). Por outro lado, também tem sido evidenciado que aquiróbichalcona, um flavonoide isolado de *A. saturoioides*, apresenta

propriedades antitumorais, sendo considerada uma molécula promissora devido à sua semelhança com outras substâncias citotóxicas frente a diferentes linhagens de células cancerosas (CARINI et al., 2015b; CARINI; KLAMT; BASSANI, 2014; HOLZSCHUH et al., 2010).

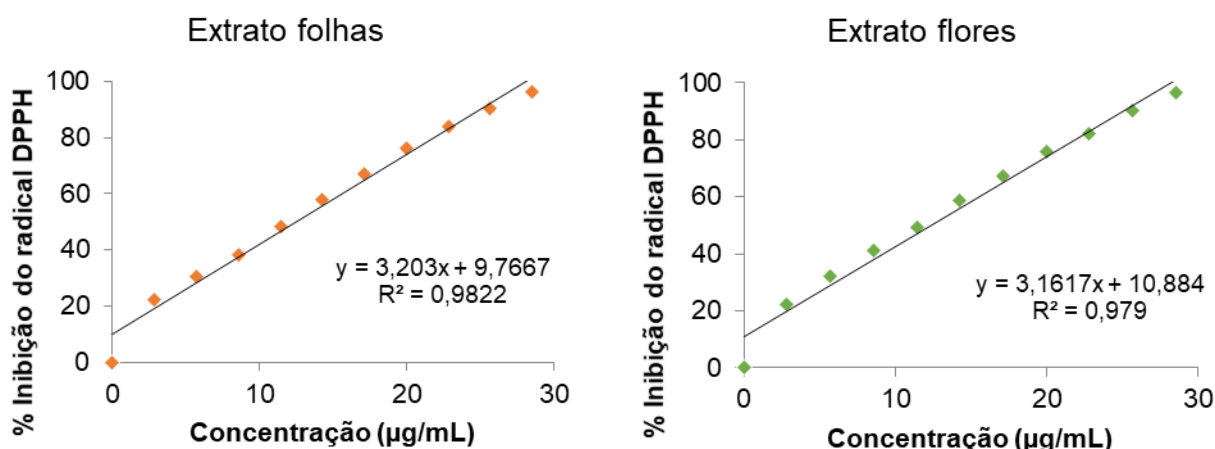
### 5.3. Avaliação da atividade antioxidante pela captura dos radicais livres DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup>

A avaliação da atividade antioxidante pela captura do radical livre DPPH<sup>•</sup> é um modelo amplamente utilizado e conveniente para a realização de “screening” de amostras com diferentes polaridades. O DPPH<sup>•</sup> é um radical livre estável que a temperatura ambiente produz cor violeta em solução alcoólica. Quando os radicais são removidos por antioxidantes através da doação de hidrogênio formam a molécula estável de DPPH como mostrado na Figura 11, o DPPH<sup>•</sup> é reduzido formando 2,2- difenilpicril-hidrazina de coloração amarela, produzindo uma queda da intensidade da coloração que pode ser quantificada e analisada no comprimento de onda de 517 nm.



**Figura 11.** Estabilização do radical DPPH<sup>•</sup> por um antioxidante (RUFINO et al., 2007)

Na Figura 12 estão apresentadas as curvas de inibição do radical DPPH<sup>•</sup> pelos extratos de folhas (a) e flores (b). Como amostra de referência para a verificação dos valores de redução da absorvância foi utilizado como branco o DPPH<sup>•</sup> com o solvente usado para obtenção das diluições dos extratos ensaiados e, como padrões positivos, ácido ascórbico, ácido gálico, quercetina e rutina. Os resultados da redução do DPPH<sup>•</sup> pelos extratos hidroalcolóicos de folhas e flores da *A. saturoioides* estão reportados na Tabela 11.



**Figura 12.** Curva da porcentagem de Inibição (%) do radical DPPH<sup>•</sup>. (a) Extrato de folhas (b) Flores

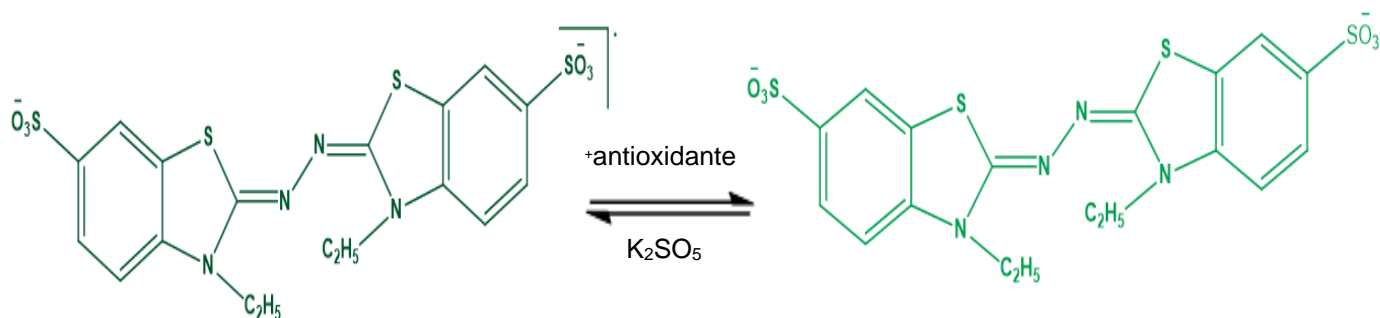
**Tabela 11.** Resultados da redução dos radicais DPPH<sup>•</sup> pelos extratos de *A. saturoioides* e padrões

Amostras	Concentração efetiva 50% (CE <sub>50</sub> )(µg/mL)
Extrato de folhas	12,56 ±0,12
Extrato de flores	12,37±0,06
Ácido ascórbico	2,48±0,23
Ácido gálico	3,44±0,25
Quercetina	9,36±0,69
Rutina	3,44±4,98

Os resultados mostrados na Tabela 11 foram expressos em EC<sub>50</sub> ou concentração efetiva, que corresponde à quantidade de extrato ou padrão que foi necessária para reduzir a concentração do radical DPPH<sup>•</sup> em 50%; assim, quanto menor o CE<sub>50</sub>, melhor é a capacidade antioxidante da substância. Os extratos de

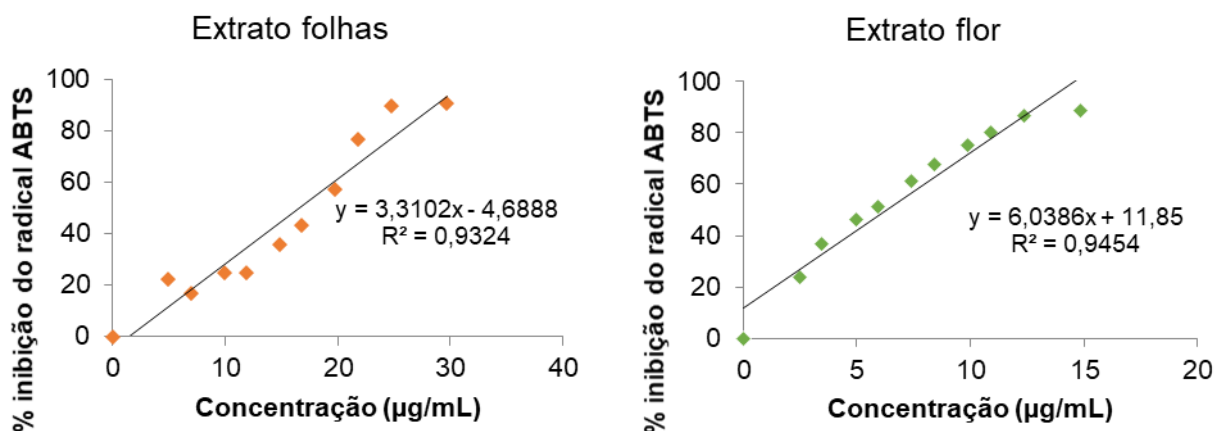
folhas e flores apresentaram atividade antioxidante ( $CE_{50}$ :  $12,56 \pm 0,12 \mu\text{g/mL}$ ;  $CE_{50}$ :  $12,37 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$  respectivamente), no entanto, em comparação com os padrões, a substância que apresentou maior capacidade em sequestrar o radical livre DPPH foi o ácido ascórbico, cujo valor de  $CE_{50}$  foi de  $2,48 \pm 0,23 \mu\text{g/mL}$ , seguido pelo ácido gálico e a rutina ( $3,44 \pm 0,25 \mu\text{g/mL}$ ) e finalmente a quercetina ( $9,36 \pm 0,69 \mu\text{g/mL}$ ).

Por outro lado, também foi avaliada atividade antioxidante dos extratos brutos pelo método de captura do cátion radical  $ABTS^{+\bullet}$ , o qual é gerado por meio de uma reação química eletroquímica ou enzimática a partir de seu precursor, o ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolína-6- sulfônico) como mostrado na Figura 13:



**Figura 13.** Estabilização do radical  $ABTS^{+\bullet}$  por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio

Os valores obtidos na análise de inibição do cátion radical  $ABTS^{+\bullet}$  estão representados na Figura 14 e Tabela 12. A Figura 24, corresponde à curva da porcentagem de inibição do cátion radical  $ABTS^{+\bullet}$  pelos extratos de folhas (a) e flores (b) da *A. saturoioides*.



**Tabela 12.** Resultados da redução do cátion radical ABTS<sup>•+</sup> pelos extratos de *A. saturoioides* e padrões

Amostras	Concentração efetiva CE <sub>50</sub> (µg/mL)
Extrato de folhas	16,52±0,77
Extrato de flores	12,56±0,24
Quercetina	1,06±0,01
Rutina	6,07±0,05

**Figura 14.** Curva da porcentagem de Inibição (%) do cátion radical ABTS<sup>•+</sup>. (a) Extrato de folhas (b) Flores

Os valores de capacidade antioxidante obtidos pelo método ABTS<sup>•+</sup>, mostraram que os extratos de folhas (CE<sub>50</sub>: 16,52±0,77µg/mL) e flores (CE<sub>50</sub>: 12,56±0,24 µg/mL), assim como os padrões testados apresentaram capacidade antioxidante, no entanto, o ácido gálico foi a amostra com melhor atividade, pois se obteve um valor de CE<sub>50</sub> de 0,53±0,01 µg/mL, seguido pela quercetina (CE<sub>50</sub>: 1,06±0,01 µg/mL) o ácido ascórbico (CE<sub>50</sub>: 1,33±0,02 µg/mL) e a rutina (CE<sub>50</sub>: 6,07±0,05 µg/mL).

A partir dos resultados obtidos sobre o potencial antioxidante, se observou que os valores adquiridos pelo método com ABTS<sup>•+</sup> são próximos com os valores obtidos no ensaio de captura do radical DPPH<sup>•</sup>, permitindo desta forma, a

verificação da consistência da atividade antioxidante dos extratos de folhas e flores, uma vez que em ambos os testes verificaram que o extrato de flores apresenta maior capacidade inibitória em comparação ao extrato de folhas.

Cabe ressaltar que os valores de  $CE_{50}$  obtidos para os extratos pelos dois métodos comparados aos valores de  $CE_{50}$  dos padrões, são diferentes e superiores, uma vez que os padrões escolhidos além de ser conhecidos pelo seu alto potencial antioxidante, se encontravam em estado puro, quando comparado aos extratos, que são misturas complexas, não sendo possível, sem a purificação e/ou isolamento adequado, conhecer a concentração real dos ativos antioxidantes. No entanto, os resultados confirmam que os dois extratos vegetais possuem atividade sequestradora e/ou inibidora de radicais livres, propriedade que poderia ser atribuída à presença de substâncias fenólicas nos extratos, como os flavonoides (GORDON, 1996; ISHIKAWA et al., 2014; PIETTA, 2000) havendo evidências científicas para tal consideração (KATALINIĆ et al., 2004; PIETTA, 2000). Por este motivo se procedeu a realizar uma análise mais exaustivo do perfil químico dos extratos e confirmar a presença de flavonoides na planta.

#### 5.4 Investigação do mecanismo de inibição da biossíntese de ergosterol

A inibição da biossíntese de ergosterol foi verificada pela quantificação de ergosterol extraído de culturas das cepas de Tr1, Mc, Tr1 FOC e Tm tratadas com os extratos de folhas e flores da planta *A. saturoioides* e com os antifúngicos: cetoconazol e fluconazol. As porcentagens de redução de ergosterol presentes em cada extração estão apresentadas na Tabela 13:

**Tabela 13.** Média do conteúdo de ergosterol em relação ao peso seco da célula, em parênteses são apresentadas as variações de porcentagens de ergosterol.

a) Microrganismo	Tr1	Mc	Tm	Tr1 FOC
Sem tratamento	0,177	0,293	0,673	0,144
Extrato Folha	0,731(412,99%)	1,002(341,97%)	0,910(135,21%)	0,728(505,55%)
Extrato Flor	0,006(33,89%)	0,031(10,58%)	0,011(1,63%)	0,009(6,25%)
Fluconazol	0,148 (83,61%)	0,151(51,53%)	0,534(79,34%)	0,016(11,11%)
Cetoconazol	0,010(5,64%)	0,007(2,38%)	0,004(0,59%)	0,005(3,47%)

a) Microrganismo: Tr1: *T. rubrum* isolado clínico; Mc: *M. canis*; Tr1 FOC: *T. rubrum* Fundação Osvaldo Cruz; Tm: *T. mentagrophytes*

Observou-se que o extrato de flores de *A. saturoioides* reduziu significativamente os teores de ergosterol de todas as cepas dermatofíticas da mesma forma que o cetoconazol. Por outro lado, nas células fúngicas tratadas com o extrato de folhas foi notado um aumento da quantidade de ergosterol quando comparados com o controle sem tratamento. No caso das culturas tratadas com fluconazol, não se observou uma redução de ergosterol significativa com exceção da cepa Tr1 FOC. Na Figura 15 pode-se visualizar o espectro característico de quatro picos do ergosterol para cada espécie de dermatófitos tratados com os extratos e os antifúngicos e a correlação destes com o controle das espécies sem tratamento.



Como se observa nos espectros no UV, em todas as culturas tratadas com o extrato de flores e cetoconazol, não se evidencia a formação das quatro bandas características da absorvância do ergosterol, aparecendo como se fosse praticamente uma linha plana, confirmando o efeito de redução da síntese desse composto.

Apesar que o cetoconazol e o fluconazol corresponderem e pertencerem ao mesmo grupo de antifúngicos (azóis) e seu mecanismo de ação estar relacionado com a inativação da enzima C-14- $\alpha$ -demetilase, os resultados mostraram que apenas o cetoconazol inibiu a síntese de ergosterol em todas as cepas, e o fluconazol apenas na cepa Tr1FOC e Mc; isto poder ter ocorrido já que nem todas as espécies têm o mesmo padrão de suscetibilidade (FERNÁNDEZ-TORRES et al., 2002; MAGAGNIN et al., 2011). Algumas pesquisas têm demonstrado que os dermatófitos são capazes de adquirir resistência a determinados antimicóticos, por exemplo a resistência de diferentes cepas dermatofíticas frente ao fluconazol está registrada em vários estudos onde se precisou de elevadas concentrações deste fármaco para poder obter um efeito fungistático ( $>64\mu\text{g/mL}$ ), considerando os parâmetros estabelecidos pelo documento M38-A do CLSI para fungos filamentosos (KURUP et al., 2021; MARKANTONATOU et al., 2020; SANTOS; HAMDAN, 2007; SINGH et al., 2019).

Por outro lado, os resultados mostraram também que as culturas tratadas com o extrato de flores, apresentaram um comportamento semelhante com as culturas tratadas com cetoconazol, indicando aparentemente que o mecanismo de ação frente as cepas dermatofíticas está relacionado à inibição da síntese do ergosterol.

### **5.5 Análise do efeito de complexação com ergosterol exógeno**

Para verificar se o mecanismo de ação dos extratos de folhas e flores da *A. saturoioides* tinham relação com a ligação às moléculas de ergosterol, adicionou-se ergosterol exógeno obtendo-se os resultados apresentados na Tabela 14.

**Tabela 14.** Valores de CIM dos extratos de *A. saturoioides* e os antifúngicos com adição de ergosterol exógeno

<b>Tr1</b>		
<b>Amostra</b>	<b>CIM sem ergosterol (µg/mL)</b>	<b>CIM com ergosterol exógeno (µg/mL)</b>
Extrato Folha	312,5	78,125
Extrato Flor	625	2500
Fluconazol	1	1
Cetoconazol	2	1
Terbinafina	0,031	0,625
Anfotericina B	1,5	4
<b>Mc</b>		
<b>Amostra</b>	<b>CIM sem ergosterol (µg/mL)</b>	<b>CIM com ergosterol exógeno (µg/mL)</b>
Extrato Folha	312,5	78,125
Extrato Flor	312,5	625
Fluconazol	16	4
Cetoconazol	16	16
Terbinafina	0,062	0,25
Anfotericina B	4	4
<b>Tm</b>		
<b>Amostra</b>	<b>CIM sem ergosterol (µg/mL)</b>	<b>CIM com ergosterol exógeno (µg/mL)</b>
Extrato Folha	625	625
Extrato Flor	625	1250
Fluconazol	32	32
Cetoconazol	16	4
Terbinafina	0,250	0,500
Anfotericina B	4	16
<b>Tr1 FOC</b>		
<b>Amostra</b>	<b>CIM sem ergosterol (µg/mL)</b>	<b>CIM com ergosterol exógeno (µg/mL)</b>
Extrato Folha	625	625
Extrato Flor	625	2500
Fluconazol	16	32
Cetoconazol	16	32
Terbinafina	0,031	0,25
Anfotericina B	4	4

Como se observa nos resultados nas culturas tratadas com extrato de folhas em presença de ergosterol não se evidenciou um aumento na CIM, comparado com as culturas tratadas com extrato de flores, onde se comprovou um aumento

na Concentração Inibitória Mínima, sendo mais evidente na cepa Tr1 e Tr1 FOC (2500 µg/mL).

Por outro lado, as CIM correspondentes às culturas tratadas com cetoconazol e fluconazol não tiveram muita variação com os valores das concentrações das CIM, das culturas sem adição de ergosterol exógeno. Os resultados demonstram também que a Anfotericina B, complexou-se com o ergosterol, e isso foi evidente nas culturas de Tr1 e Tm, onde o valor de CIM sofreu incremento de 4 vezes. Os resultados sugerem então, que possivelmente a ação do extrato de flores frente às cepas dermatofíticas pode ocorrer sobre a membrana plasmática envolvendo a ligação com ergosterol.

### 5.6. Efeito protetor do sorbitol

A parede celular fúngica representa uma estrutura de proteção de choques externos e define as propriedades de comunicação celular e por tanto do crescimento celular, em fungos filamentosos a formação da parede está associado ao processo de crescimento de hifas por tanto cumpre um papel importante na viabilidade dos fungos. Por isto, julgou-se necessário estudar a interferência dos extratos de folhas e flores frente às cepas dermatofíticas na presença do estabilizante sorbitol.

A Tabela 15 mostra os valores de CIM dos extratos de folhas e flores e os antifúngicos CTZ, FLZ e ANFO B na presença e ausência de sorbitol na concentração de 0,8 M.

**Tabela 15.** Valores de CIM dos extratos de *A. saturoioides* e os antifúngicos com adição de sorbitol

<b>Tr1</b>		
<b>Amostra</b>	<b>CIM sem sorbitol (µg/mL)</b>	<b>CIM com sorbitol (µg/mL)</b>
Extrato Folha	312,5	1458,3
Extrato Flor	625	625
CAS	16	32
CTZ	2	4,0
FLZ	1	0,5
ANFO B	1,5	1,0
<b>Mc</b>		

<b>Amostra</b>	<b>CIM sem sorbitol (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>CIM com sorbitol (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
Extrato Folha	312,5	833,3
Extrato Flor	312,5	260,5
CAS	1	16
CTZ	16	42,7
FLZ	16	26,7
ANFO B	4	10,7

**T<sub>m</sub>**

<b>Amostra</b>	<b>CIM sem sorbitol (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>CIM com sorbitol (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
Extrato Folha	625	2083,3
Extrato Flor	625	625
CAS	16	64
CTZ	16	64
FLZ	32	26,7
ANFO B	4	1,7

**Tr<sub>1</sub> FOC**

<b>Amostra</b>	<b>CIM sem sorbitol (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>CIM com sorbitol (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
Extrato Folha	625	1041,7
Extrato Flor	625	625
CAS	16	32
CTZ	16	28,0
FLZ	16	24,0
ANFO B	4	2,1

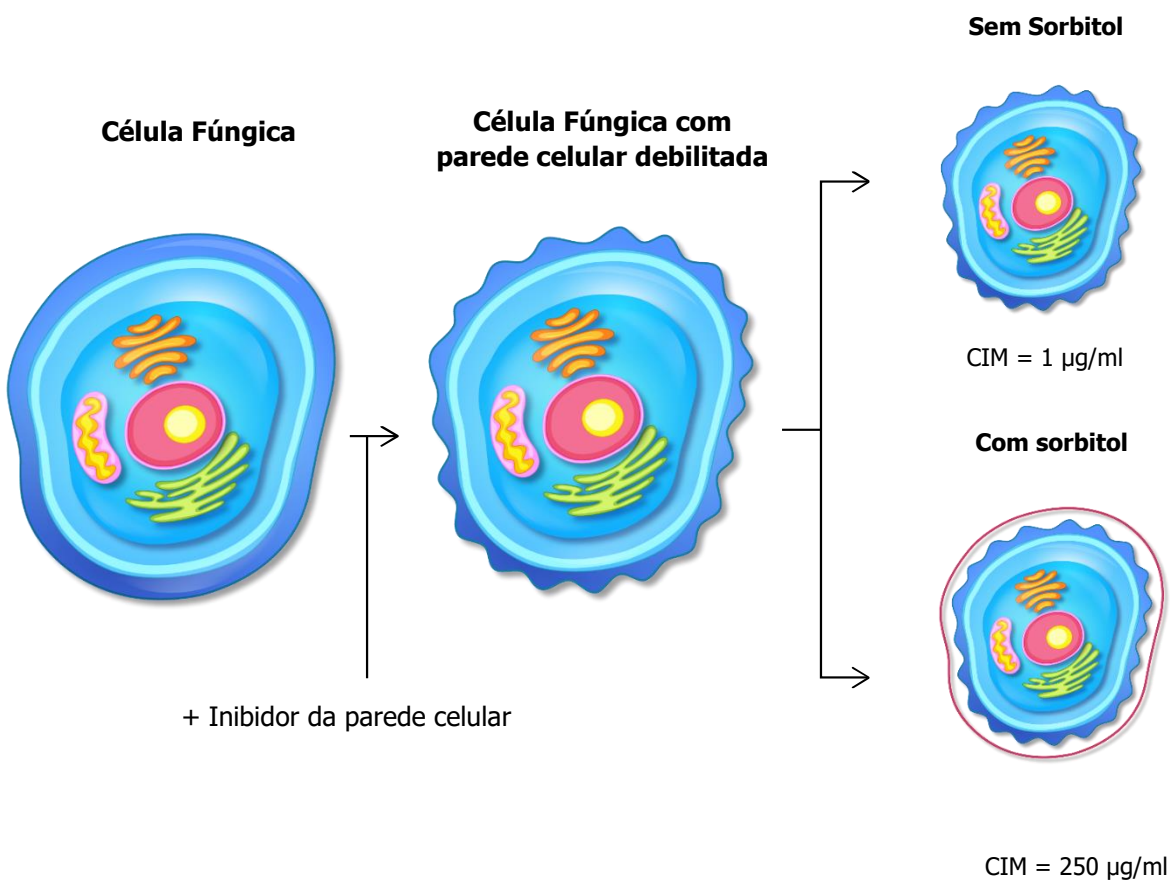
CAS: caspofungina; CTZ: cetoconazol; FLZ: fluconazol; ANFO B: anfotericina B

Os valores de CIM dos extratos de folhas frente os dermatófitos foram alterados quando comparados aos valores de CIM obtidos sem a adição de sorbitol, o que é um indício de que o extrato possivelmente afeta a parede das células fúngicas, da mesma forma, se observou um aumento dos valores de CIM nas culturas tratadas com cetoconazol. Os valores de CIM obtidos para os extratos de flores, não mudaram com relação aos valores de CIM em ausência de sorbitol, indicando que a ação dos extratos de flores pode estar relacionada a outros processos como por exemplo sobre a membrana plasmática, anteriormente mencionado.

Geralmente, os inibidores de parede celular são identificados quando a CIM obtida na presença do protetor osmótico é pelo menos duas ordens de magnitude maior como se observou nas culturas com Tr<sub>1</sub> (312,5-1458,3  $\mu\text{g/mL}$ ), Mc (312,5-

833,33  $\mu\text{g/mL}$ ), Tm (625-2083,3  $\mu\text{g/mL}$ ) e Tr1 FOC (625-1041,7  $\mu\text{g/mL}$ ) quando comparados os valores da CIM sem adição de sorbitol com as culturas tratadas com sorbitol após sete dias de incubação (FROST et al., 1995). Esse comportamento se deve a que as células fúngicas cuja parede está danificada ou alterada podem crescer na presença de um protetor osmótico (sorbitol) porque desta forma é protegida, enquanto na ausência deste, a célula morre.

Para maior clareza, a Figura 16 demonstra de forma mais ilustrativa um exemplo do comportamento da parede celular das células em presença e ausência de um inibidor de parede:



**Figura 16.** Ação do Sorbitol nas células. Fonte: Figura própria do autor

Por outro lado, apesar do CTZ e o FLZ serem azóis, ou seja, seu mecanismo não está ligado à ação sobre a parede celular, através dos resultados se

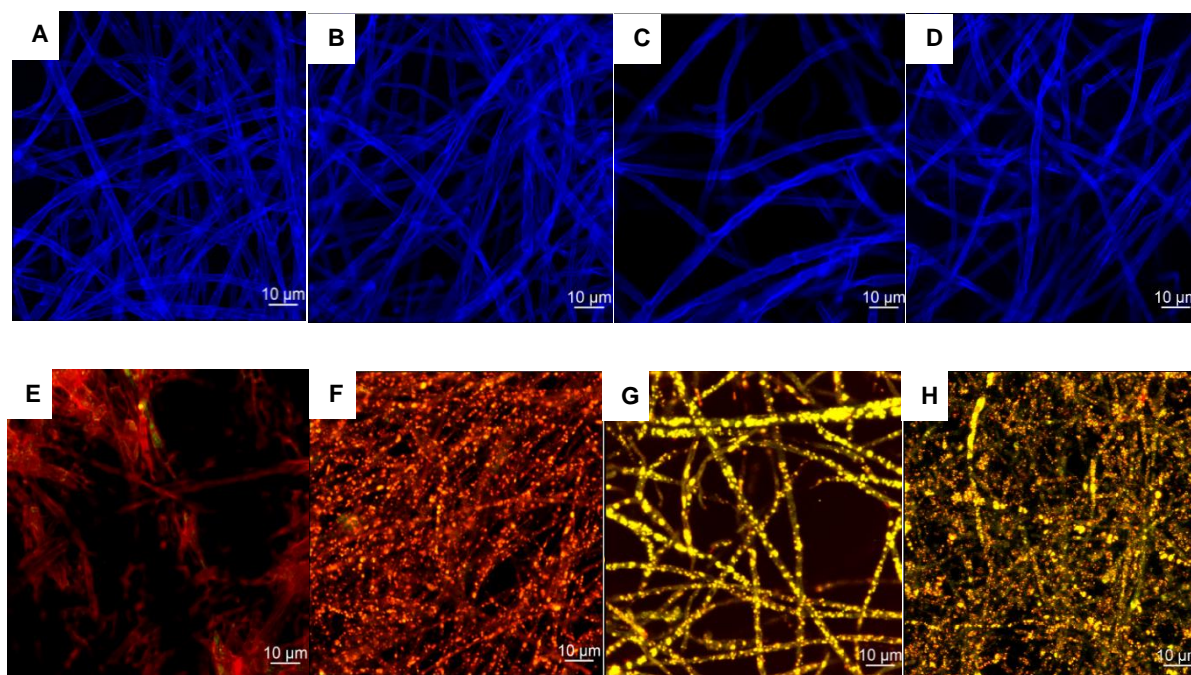
evidenciou que em todas as cepas tratadas com CTZ houve um aumento da concentração da CIM, da mesma forma que nas culturas de Mc e Tr1 FOC tratadas com FLZ. Com relação a ANFO B, que é um polieno, encontrou-se que unicamente nas culturas de Mc, houve aumento do valor da CIM na presença do sorbitol.

### **5.7 Estudo da presença de lipídeos neutros e da integridade da parede celular nos dermatófitos por microscopia confocal**

O Calcofluor White (CW) é um fluorocromo amplamente utilizado na localização da quitina. A quitina é uma grande cadeia de homopolímeros hidrofóbicos de  $\beta$ -(1-4)- N-acetil-D-glucosamina e está presente na parede celular proporcionando rigidez e integridade estrutural (COHEN, 1993; HENRIQUES et al., 2020; PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009). O CW tem a capacidade de fazer ligações de hidrogênio orientadas às microfibrilas estruturais do polissacarídeo  $\beta$  1-4, exibindo fluorescência em uma faixa de 410-470 nm, quando exposto à luz ultravioleta (HERTH; SCHNEPF, 1980), dessa forma foi possível estudar o efeito dos extratos de folhas e flores e do fluconazol sobre a estrutura da parede celular das hifas do *T. mentagrophytes*, *M. canis* e *T. rubrum*.

As cepas também foram analisadas com o marcador fluorescente VN (Vermelho do Nilo), para estabelecer a presença de corpos lipídicos nas cepas dermatofíticas após tratamento com os extratos e o fluconazol. O VN, caracteriza-se por apresentar uma emissão de fluorescência intensa e estável após excitação com laser de HeNe a 543 nm. Devido a sua alta lipofilicidade ( $\log P_{o/a} > 3$ ) e baixo peso molecular (318,4 g/mol) este composto é capaz de se ligar aos lipídeos neutros presente nas células e emitir uma forte fluorescência (BOREN; BRINDLE, 2012; LOMBARDI BORGIA et al., 2005).

As imagens de microscopia confocal das culturas de *T. mentagrophytes* tratadas extratos de folha e flor (312,5  $\mu\text{g/mL}$ ) e fluconazol (16  $\mu\text{g/mL}$ ) e sem tratamento estão representadas na Figura 17. As imagens da A-D correspondem às culturas observadas com o fluorocromo Calcofluor White e as imagens E-H as culturas incubadas com Vermelho do Nilo.



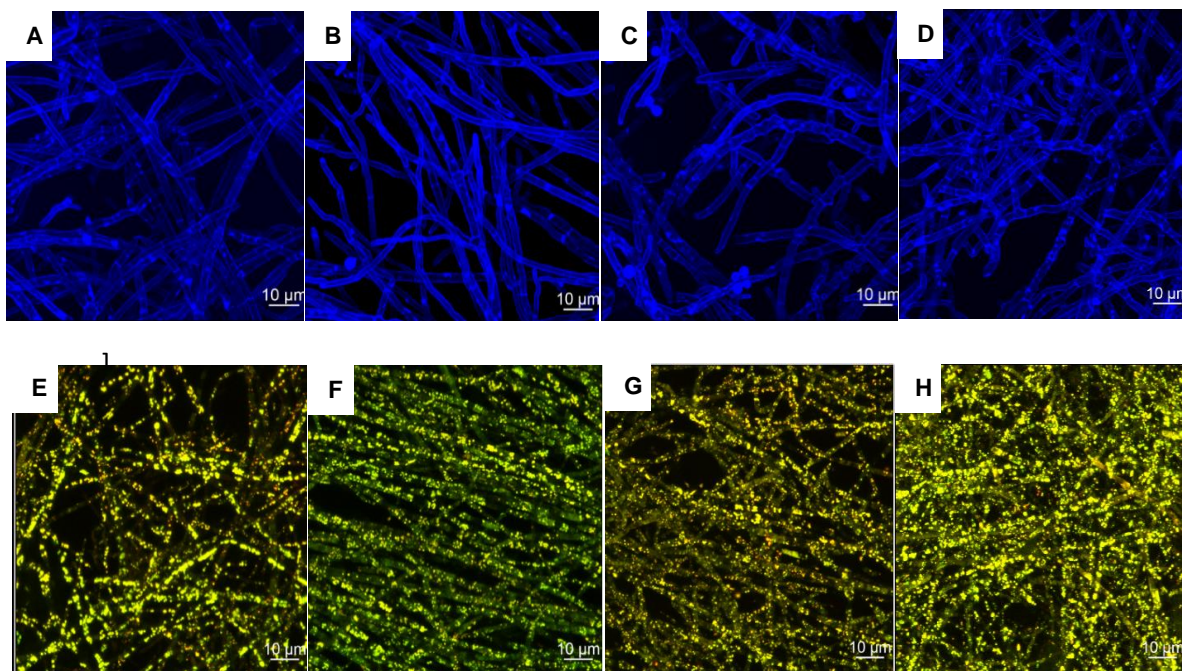
**Figura 17.** Microscopia de imunofluorescência da cepa *T. mentagrophytes* coradas com Calcofluor White (A-D) e com Vermelho do Nilo (E-H). (A e E) culturas tratadas com extrato de folha (312,5 µg/mL); (B e F) culturas tratadas com extrato de flor (312,5 µg/mL); (C e G) culturas tratadas com fluconazol (16 µg/mL); (D e H) culturas controle a escala de 10 µm.

Como se observa na Figura 17, as imagens A e B (Culturas tratadas com extrato folha e flor respectivamente), as hifas apresentam leves alterações na parede celular e no comprimento, quando comparado com os filamentos da cultura controle (D). Por outro lado, as culturas tratadas com fluconazol (C), mostraram uma menor formação de filamentos e as membranas e paredes celulares da maioria das hifas sofreram modificações estruturais. Finalmente, na imagem B, se evidenciaram algumas alterações na parte interna das hifas, pois não se observa a presença de septos nem organelas celulares, como nos filamentos da cultura controle.

Através das imagens com o marcador fluorescente VN, se observaram alguns fragmentos vermelhos-alaranjados com pouca fluorescência nas culturas tratadas com o extrato de folhas, indicando que houve pouca quantidade de corpos lipídicos. Por outro lado, as culturas tratadas com o extrato de flor e o fluconazol (F e G), se observa claramente a interação corante/lipídio

(fluorescência), provavelmente, houve degradação lipídica (ergosterol), devido à pouca quantidade de pontuações brilhantes que se observam, em comparação com a cultura controle (H).

A Figura 18 corresponde às imagens de microscopia confocal das culturas de *M. canis* tratadas extratos de folha e flor (156,25 µg/mL), fluconazol (8 µg/mL) e as culturas controle (sem tratamento). As imagens da A-D correspondem às culturas observadas com o fluorocromo CW e as imagens E-H com VN.



**Figura 18.** Microscopia de imunofluorescência da cepa *M. canis* coradas com Calcofluor White (A-D) e com Vermelho do Nilo (E-H). (A e E) culturas tratadas com extrato de folha (156,25µg/mL); (B e F) culturas tratadas com extrato de flor (156,25 µg/mL); (C e G) culturas tratadas com fluconazol (8 µg/mL); (D e H) culturas controle a escala de 10 µm.

Como se observa na Figura 18, as culturas de *M. canis* tratadas com extrato de folha e flor (A e B) e fluconazol (C), apresentaram menor número de hifas, principalmente nas culturas tratadas com o fármaco, em comparação à cultura controle (D). Por outro lado, na imagem D, se evidencia a presença de hifas com parede e membrana definida, além disso, se observa a presença de septos, características que não são evidenciadas nas culturas tratadas com os extratos e o antifúngico, pois se observa uma alta fluorescência dentro dos

filamentos representando um depósito anormal de quitina, o qual acontece geralmente quando há um enfraquecimento da parede (RONCERO; DURÁN, 1985).

As imagens do *M. canis* obtidas com VN, mostraram que as culturas tratadas com extratos e o fluconazol (E, F e G), apresentaram menor quantidade de lipídios neutros em comparação à cultura controle, onde foi evidenciada diferença na quantidade de estruturas esféricas fluorescentes para cada cultura.

Os resultados observados por microscopia confocal para as cepas *T. mentagrophytes* e *M. canis* de alguma forma estão relacionados com os valores obtidos no ensaio de quantificação de ergosterol, onde foi demonstrado que o extrato de flores e o fluconazol são capazes de inibir a biossíntese deste esterol, e isso se viu refletido na diminuição de pontuações brilhantes nas culturas tratadas em comparação com as culturas controle. Com as culturas tratadas com o extrato de folhas, ocorreu o contrário, pois foi evidenciado um aumento na porcentagem de ergosterol que, entretanto, não foi demonstrado nas imagens obtidas no confocal, onde se evidenciou uma diminuição de lipídeos neutros. O aumento de ergosterol pode estar relacionado com outros processos tais como estresse celular, que é um sinal característico de morte celular (apoptose) (BOREN e BRINDLE, 2012; LEE et al., 2013).

Finalmente, na Figura 19 estão apresentadas as imagens de microscopia confocal das culturas de *T. rubrum* tratadas com extratos de folha (156,25 µg/mL), flor (312,5 µg/mL) e fluconazol (2 µg/mL) e as culturas controle (sem tratamento). As imagens foram observadas com o fluorocromo CW.

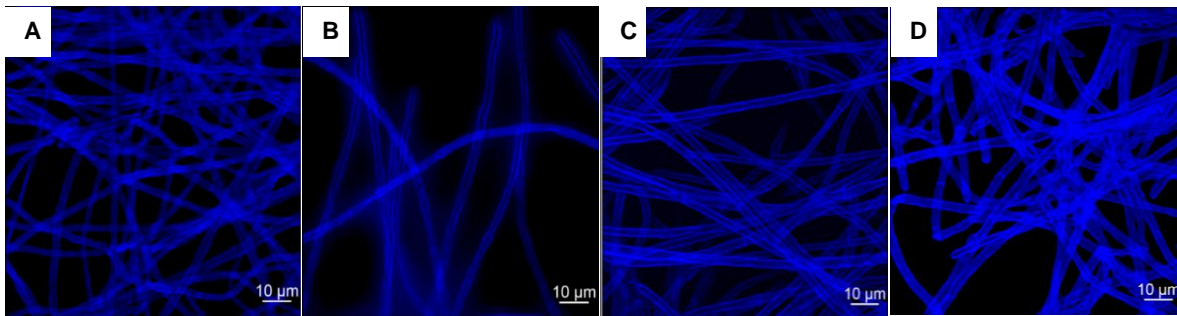


Figura 19. Microscopia de imunofluorescência da cepa *T. rubrum* coradas com Calcofluor White (A-D). (A) culturas tratadas com extrato de folha (156,2 5µg/mL); (B) culturas tratadas com extrato de flor (312,5 µg/mL); (C) culturas tratadas com fluconazol (2 µg/mL); (D) culturas controle a escala de 10 µm.

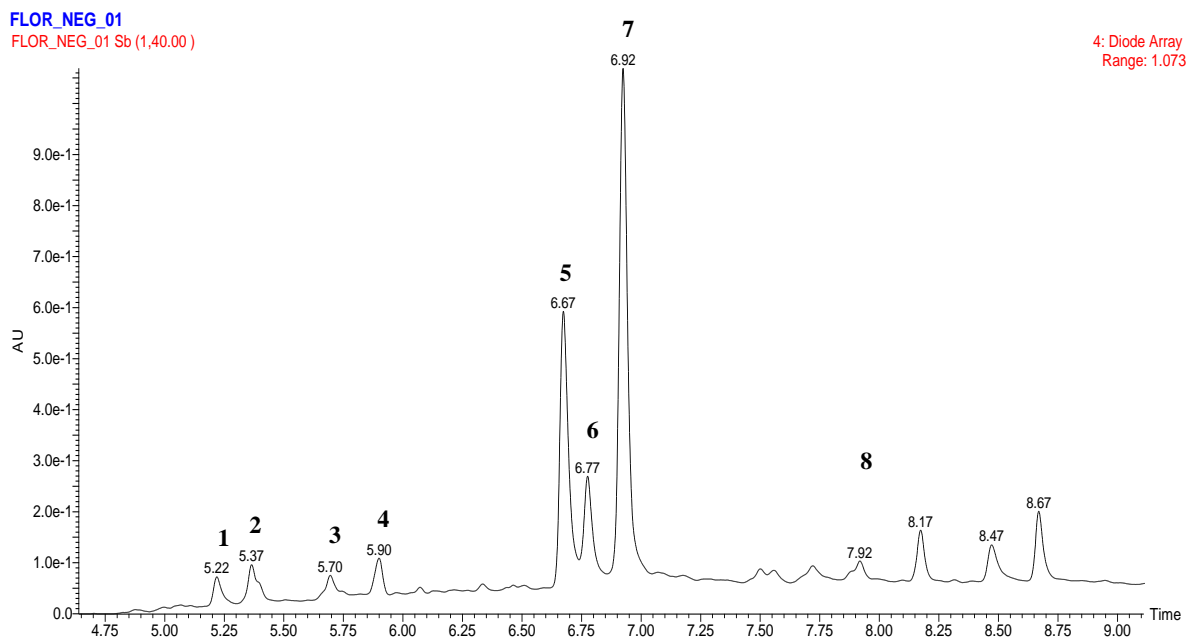
As imagens apresentadas na Figura 19, mostram uma grande diferença na estrutura morfológica das hifas das culturas controle com relação as culturas tratadas com extratos e com o fluconazol, não só no comprimento dos filamentos como também na quantidade de quitina presente. As hifas tratadas apresentaram menor quantidade de quitina, isso foi evidente pela pouca fluorescência nas imagens, além disso a maioria de hifas carecem de septos e organelas celulares, principalmente nas culturas tratadas com o extrato de flor (C), onde se observou menor quantidade de filamentos.

A partir destas observações foi possível deduzir, que os extratos foram capazes de alterar a estrutura da parede e da membrana celular das cepas, o que provavelmente causou o estresse celular, provocando a inibição celular.

## 5.8 Análises do perfil químico dos extratos de folhas e flores de *A. saturoioides* por UPLC-QTOF-MS/MS

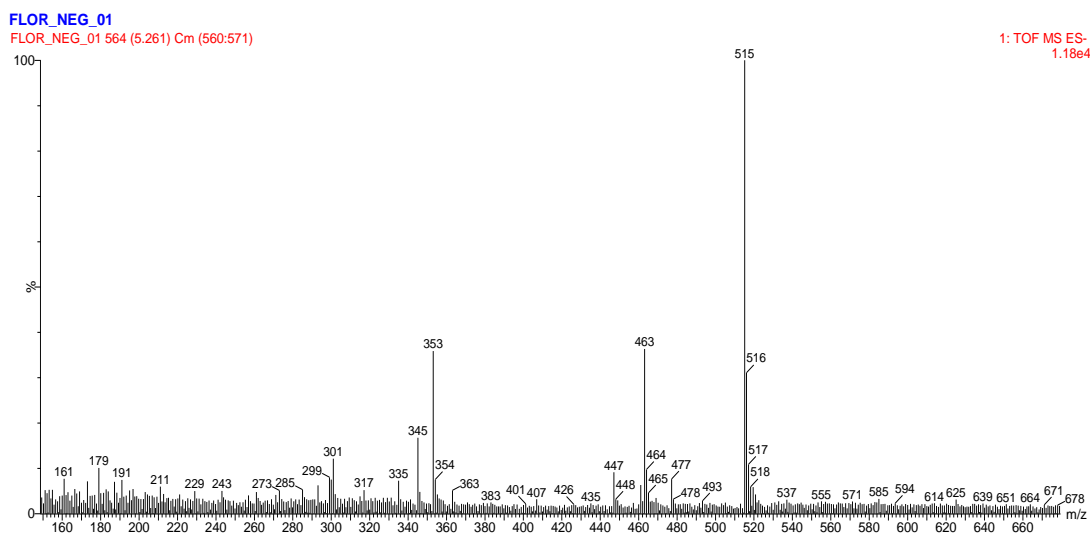
Para obter informação mais detalhada sobre a estrutura química dos compostos presentes nos extratos hidroalcolóolicos de folhas e flores da planta *A. saturoioides*, foi utilizada técnica de espectrometria de massas de alta resolução em tandem. Através das análises dos cromatogramas obtidos no detector de arranjo de diodos, os espectros de massas ( $\text{ESI}^-$ ,  $\text{MS}^1$ ) relativos aos picos do cromatograma de íons totais (TIC) obtido por UPLC-UV-QTOF-MS/MS, os valores de  $m/z$  observada e calculada para cada substância no estudo de fragmentação dos íons base ( $\text{ESI}^-$ ,  $\text{MS}^2$ ) e os espectros UV característicos para cada substância foi possível propor a estrutura química dos compostos presentes nos extratos, além disso foi usada informação reportada na literatura e os valores de  $m/z$  proporcionados em base de dados internacionais como Chemspider e Massbank.

Na Figura 20 se observa o cromatograma  $\text{ESI}^-$ (TIC) do extrato de flores de *A. saturoioides*. Os espectros de  $\text{MS}^2$  e UV estão consignados no Apêndice II.



**Figura 20.** Cromatograma do extrato de flores de *A. saturoioides* obtido pelo detector de arranjo de diodos modo gradiente linear de 30% de MeCN (ácido fórmico 0,1%) (v/v) para 90% de MeCN (ácido fórmico 0,1%) (v/v) em 30 min, vazão 0,25 mL/min, volume de injeção 5  $\mu\text{L}$ .

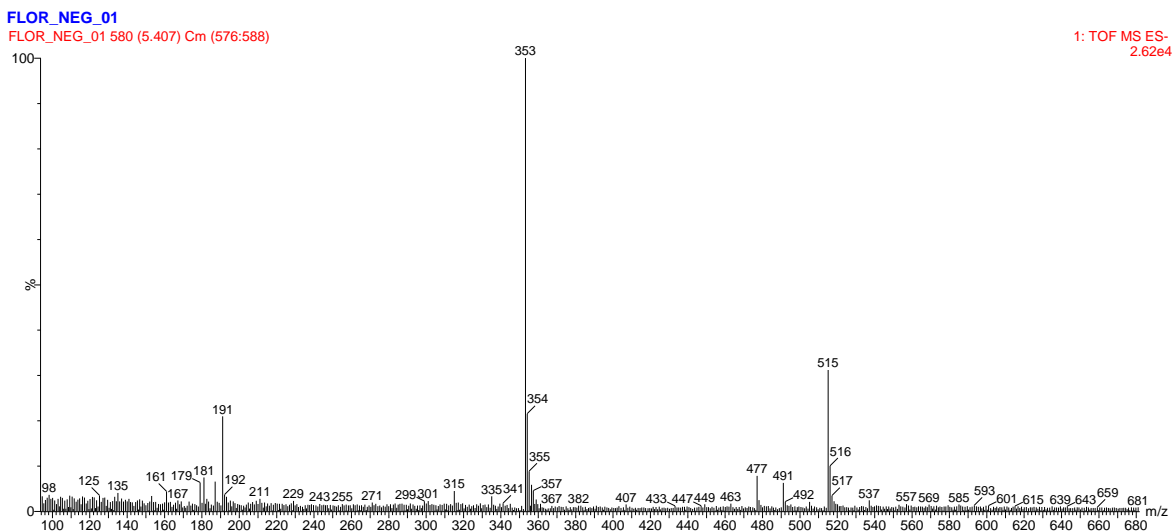
O pico 1 ( $t_R$  de 5,22 min, normalização de áreas  $\lambda$  328 nm) foi identificado como ácido 3,5-di-*O*-cafeoilquínico ( $C_{25}H_{24}O_{12}$ , 516,1267 Da). Este pico apresentou espectro de massas (ESI<sup>-</sup>, MS<sup>1</sup>, Figura 21) com um pico de  $m/z$  observado de 515, a qual é correspondente ao íon aduto  $[M-H]^-$ , sugerindo a presença de um isômero posicional de ácido di-*O*-(*E*)-cafeoilquínico.



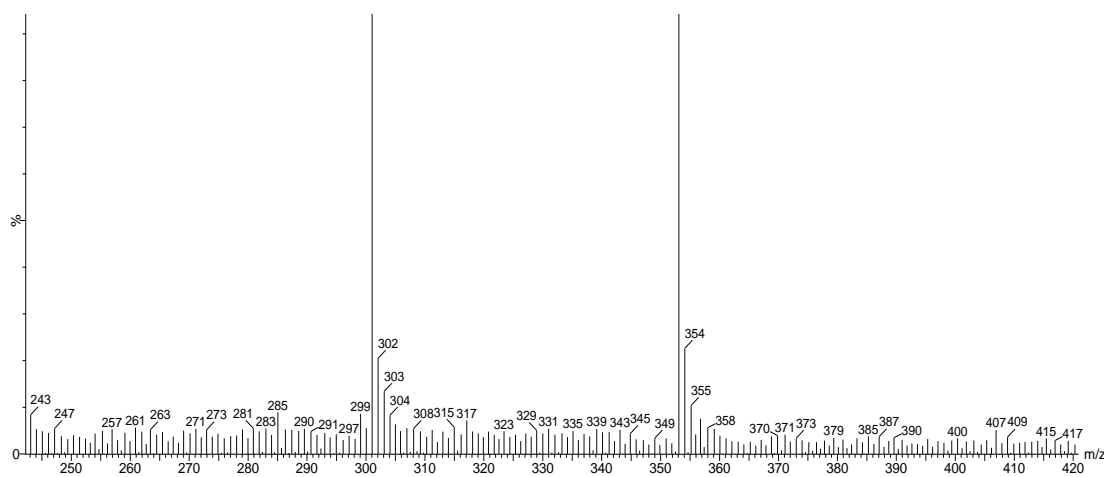
**Figura 21.** Espectro de massas ESI<sup>-</sup> do 3,5-di-*O*-cafeoilquínico,  $m/z$  515  $[M - H]^-$ .

No espectro MS<sup>2</sup> do íon precursor  $m/z$  515 (Apêndice II) pode-se observar o padrão de fragmentação bem definido  $[M-H]^- = 515$ ;  $[M-H-162]^- = 353$ ;  $[M-H\text{-ácido caféico}]^- = 179$ ;  $[M-H\text{-ácido quínico}]^- = 191$ , sendo os íons de  $m/z$  353, 191, 179 característicos de um derivado de ácido quínico.

Os picos 2 e 3 ( $t_R$  de 5,37 min,  $t_R$  de 5,70, normalização de áreas  $\lambda$  329 nm) foram identificados como os isômeros *cis/trans* de ácido 5-*O*-cafeoilquínico e o ácido *trans*-4-*O*-cafeoilquínico ( $C_{16}H_{18}O_9$ , 354.0950 Da). Os picos 2 e 3 apresentaram espectros de massas (ESI<sup>-</sup>, MS<sup>1</sup>) como se mostram nas Figuras 22 e 23 respectivamente. O pico de  $m/z$  353, corresponde em ambos os casos à perda de uma das partes do ácido caféico  $[M-H\text{-cafeoil}]^-$ .



**Figura 22.** Espectro de massas ESI<sup>-</sup> do ácido cis/trans 5-*O*-cafeoilquínico,  $m/z$  353 [M - H]<sup>-</sup>.



**Figura 23.** Espectro de massas ESI<sup>-</sup> do *trans*-4-*O*-cafeoilquínico,  $m/z$  353 [M - H]<sup>-</sup>.

Nos espectros MS<sup>2</sup> (Apêndice I), do íon precursor  $m/z$  353 para os dois compostos, se observa a aparição de outros picos de massa carga  $m/z$  131,  $m/z$  179 e  $m/z$  191 característicos dos derivados dos ácidos quínicos.

Nos picos 4 e 6 ( $t_R$  de 5,90 min,  $t_R$  de 6,77, normalização de áreas  $\lambda$  329 nm,  $\lambda$  285 nm respectivamente) correspondem aos compostos kaempferol e luteolina (C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>6</sub>, 286,0477 Da). Os picos 4 e 6 apresentaram espectros de massas (ESI<sup>-</sup>, MS<sup>1</sup>) como se mostram nas Figuras 24 e 25 respectivamente. O pico de  $m/z$  285, foi evidenciada a formação do íon base  $m/z$  de 285 para ambos

compostos, e corresponde ao fragmento de aglicona desprotonado característicos da luteolina ou kaempferol.

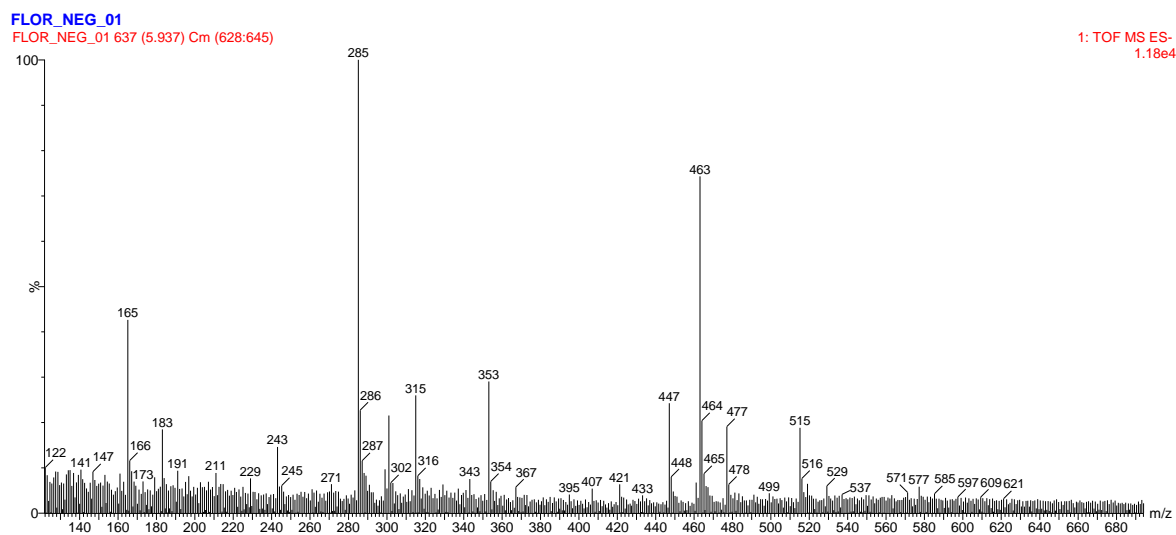


Figura 24. Espectro de massas ESI<sup>-</sup> do kaempferol,  $m/z$  285 [M - H]<sup>-</sup>.

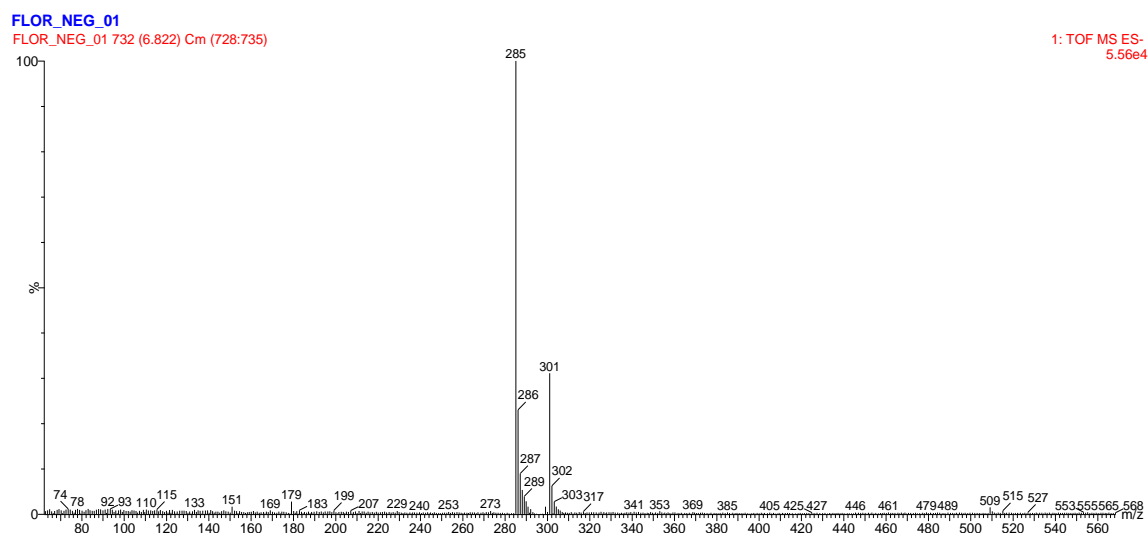
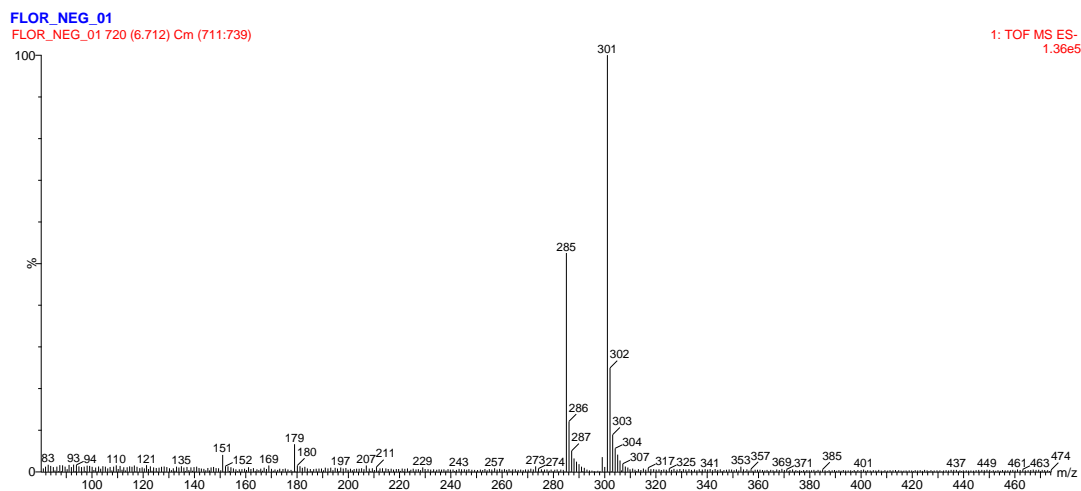


Figura 25. Espectro de massas ESI<sup>-</sup> do luteolina,  $m/z$  285 [M - H]<sup>-</sup>.

O tipo de aglicona foi ainda confirmado pelo espectro MS<sup>2</sup> (Apêndice I) para dar mais informações. Os íons característicos do produto em  $m/z$  255 e 227 levaram à identificação da aglicona como kaempferol.

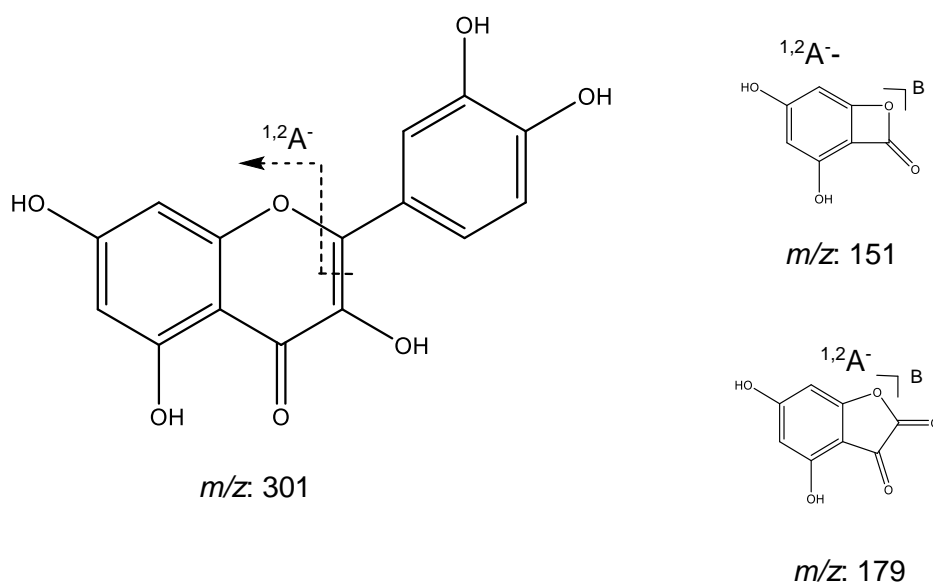
O pico 5 ( $t_R$  de 6,67 min, normalização de áreas  $\lambda$  253 nm) foi identificado como a quercetina (C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>, 320,0532 Da). Este pico apresentou espectro de massas (ESI<sup>-</sup>, MS<sup>1</sup>, Figura 26) com um pico de  $m/z$  observado de 301, referente ao

íon radical da aglicona ( $[M-H^{132}]^-$ ) oriundo da clivagem homolítica da ligação O-glicosídica, o que é proposto em diversos estudos acerca de quercetinas glicosiladas (CUYCKENS; CLAEYS, 2004; FELIPE et al., 2014; GOUVEIA; CASTILHO, 2011; HVATTUM; EKEBERG, 2003).



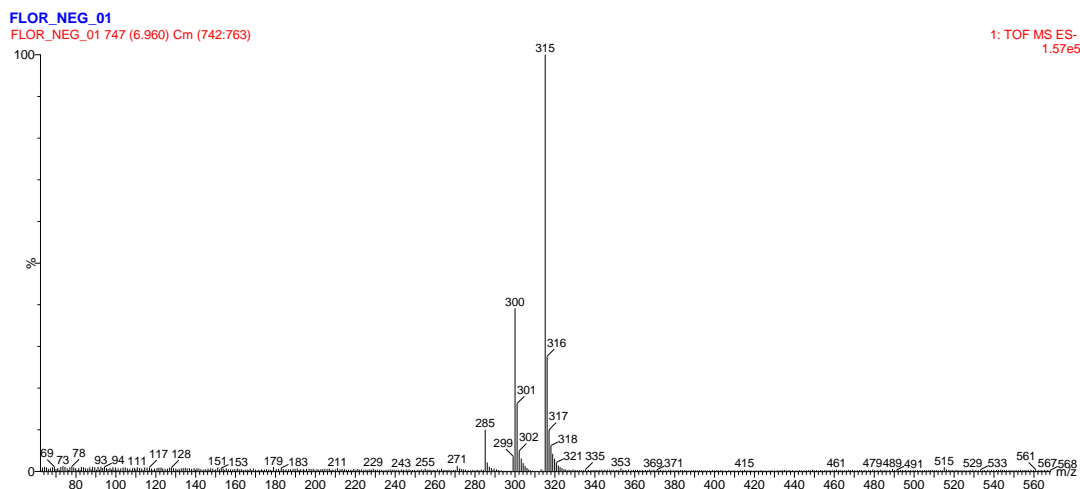
**Figura 26.** Espectro de massas ESI- da quercetina,  $m/z$  301  $[M - H]^-$

Os fragmentos observados no espectro  $MS^2$  (Apêndice I) de  $m/z$  179 e  $m/z$  151, que correspondem aos valores de massa/carga dos íons formados pela termociclagem do anel A-C ( $1,2A^-$ ) e a perda consecutiva de CO respectivamente (Figura 27) (CUYCKENS; CLAEYS, 2004).



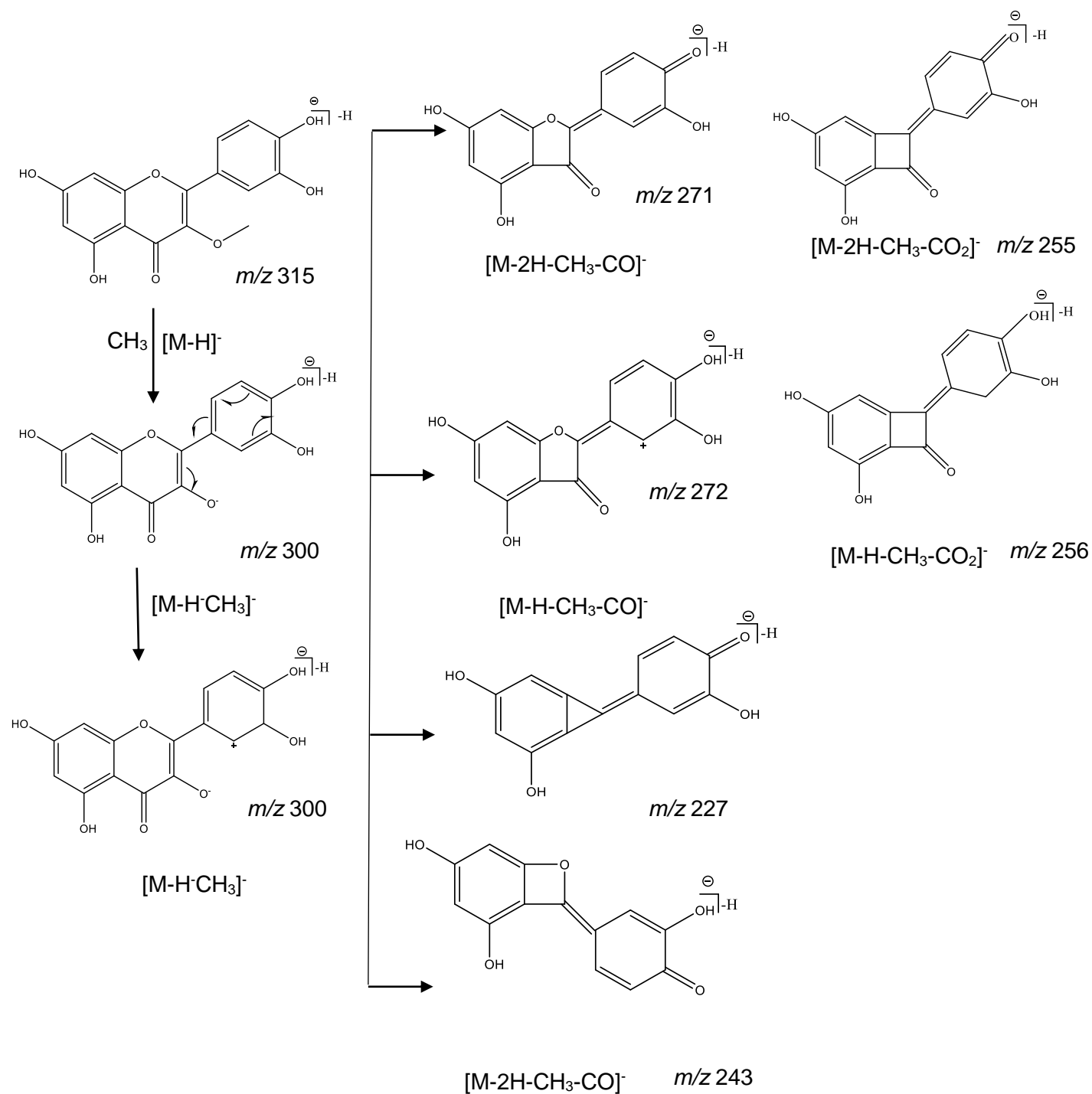
**Figura 27.** Fragmentação Quercetina  $MS/MS$   $m/z: 301$

Por outro lado, o pico 7 ( $t_R$  de 6,92 min, normalização de áreas  $\lambda$  253 nm) referente ao composto 3-O-metil-quercetina ( $C_{16}H_{12}O_7$ , 316,0582 Da). Este pico mostrou um espectro de massas (ESI<sup>-</sup>, MS<sup>1</sup>, Figura 28), onde se observou a formação do íon molecular  $m/z$ : 315 produto da ionização negativa (KOOLEN et al., 2013).



**Figura 28.** Espectro de massas ESI<sup>-</sup> da 3-O-metil-quercetina,  $m/z$  315 [M - H]<sup>-</sup>.

No espectro MS<sup>2</sup> do íon precursor  $m/z$  315 (Apêndice II) pode-se observar o fragmento de  $m/z$  300, que corresponde à perda do grupo metilo -CH<sub>3</sub> do íon base [M - H]<sup>-</sup>. A partir do íon base ( $m/z$  315) também se observou a perda de CO e CO<sub>2</sub>, gerando a formação dos íons  $m/z$  272, 256, 243 e 227. Os íons com  $m/z$  271 e 255 que aparecem no espectro, são produto da perda combinada de -H e CO ou CO<sub>2</sub>. Finalmente foi identificado o íon com  $m/z$  151, produto típico de uma fragmentação RDA que ocorre nos flavonoides (Figura 29) (WAN et al., 2013).



**Figura 29.** Fragmentação 3-O-metil-quercetina MS/MS  $m/z$ :315

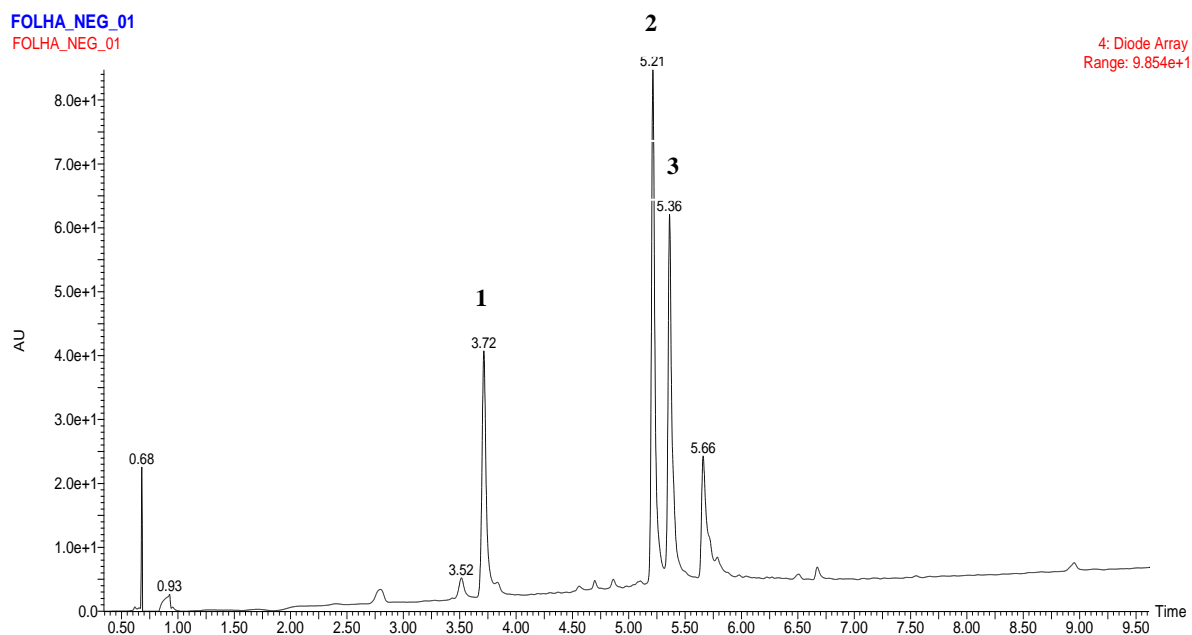
Finalmente no pico 8 ( $t_R$  de 8,17 min, normalização de áreas  $\lambda$  367 nm) ( $C_{15}H_{18}O_5$ , 314.1154 Da) se observou o íon base de  $m/z$  285 correspondentes à 4,2',4'-trihydroxy-6'-metoxychalcona, do qual não se tem muita informação, porém, o espectro UV deste composto absorveu a um comprimento de onda de 267 nm característico deste flavonoide (GRASSI-ZAMPIERON et al., 2010b).

Na Tabela 16, estão apresentadas as informações sobre os tempos de retenção, o comprimento de onda característico do espectro UV para cada substância e os valores dos íons base e os fragmentos obtidos no espectro  $MS^2$  para o extrato de flores.

**Tabela 16.** Identificação dos principais compostos no extrato de flores de *A. satureioides* por tempo de retenção, comprimentos de onda do espectro UV e íons e íons negativos obtidos por UPLC-QTOF-MS/MS

Extrato de flores						
Pico	$t_R$ (mins)	UV máx (nm)	[M-H] <sup>-</sup> ( $m/z$ )	$MS^2$ ( $m/z$ )	Composto sugerido	Bibliografia (NCUBE et al., 2014)
1	5,22	328	515	353,191, 179, 173, 135	Ácido 3,5-di-O- cafeoilquínico	
2	5,37	329	353	191,179,135	Ácido <i>trans</i> 5-O- cafeoilquinico	
3	5,70	329	353	191, 179, 173, 135	Ácido <i>trans</i> -4-O- cafeoilquínico	
4	5,90	285	285	255	Kaempferol	(GRASSI- ZAMPIERON et al., 2010b)
5	6,67	373, 253	301	179, 151,121	Quercetina	
6	6,77	252	285	151, 217	Luteolina	
7	6,92	357, 253	315	151, 227, 243 256, 272,300	3-O-metil- quercetina	
8	8,17	367	285	119, 165	4,2',4'- Trihydroxy-6'- metoxychalcona	

Da mesma forma foi analisado o cromatograma de corrente de íons totais do extrato de folhas de *A. saturoioides*. Na Figura 30 se observam os picos característicos presentes no extrato. Os espectros de MS<sup>2</sup> e UV estão consignados no Apêndice III.



**Figura 30.** Cromatograma do extrato de folhas de *A. saturoioides* obtido pelo detector de arranjo de diodos Modo gradiente linear de 30% de MeCN (ácido fórmico 0,1%) (v/v) para 90% de MeCN (ácido fórmico 0,1%) (v/v) em 30 min, vazão 0,25 mL/min, volume de injeção 5 $\mu$ L

O cromatograma obtido apresentou um perfil diferente que o cromatograma correspondente ao extrato de flores, pois na Figura 30 se evidenciam 4 picos importantes. Cada pico foi analisado considerando o tempo de retenção e foram obtidos os espectros de massas (ESI<sup>-</sup>, MS<sup>1</sup>) e as fragmentações nos espectros MS<sup>2</sup>.

Na Tabela 17 se mostram as possíveis classes de metabólitos presentes no extrato de folhas de *A. saturoioides*.

**Tabela 17.** Identificação dos principais compostos no extrato de folhas de *A. saturoioides* por tempo de retenção, comprimentos de onda do espectro UV e íons e íons negativos obtidos por UPLC-QTOF-MS/MS

Extrato de folhas						
Pico	$t_R$ (mins)	UV máx (nm)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	MS <sup>2</sup> (m/z)	Identificação	Bibliografia
1	3,72	323	353	191	Ácido 5-O- cafeoilquínico	
2	5,21	324	515	191, 179, 173, 135	Ácido 3,5-di-O- cafeoilquínico	(NCUBE, MHLONGO, <i>et</i> <i>al.</i> , 2014)
3	5,36	328	353	191, 179, 135	Ácido <i>trans</i> 5-O- cafeoilquinico	(CLIFFORD e KNIGHT, 2005)
4	5,66	328	353	191, 179, 173, 135	Ácido <i>trans</i> -4-O- cafeoilquínico	

Como se observa na Tabela 17, os picos encontrados cujos íons moleculares de  $m/z$  353 (MS<sup>2</sup>  $m/z$  173 e 191(191-H<sub>2</sub>O)) correspondem à presença de isômeros do ácido cafeoilquínico. Nos espectros também se evidenciou a formação do íon pseudomolecular de  $m/z$  515 (MS<sup>2</sup>  $m/z$  191, 179, 173 e 135) característicos do ácido dicafeoilquinico (CLIFFORD; KNIGHT; KUHNERT, 2005).

A partir destes resultados, foram escolhidos os metabólitos majoritários para serem incorporados em sistemas de liberação e desta forma poder estabelecer se iriam melhorar ou não o potencial antifúngico já evidenciado nos extratos brutos. Foram escolhidos a quercetina por ser o segundo produto majoritário no extrato de flores e o ácido 5-O- cafeoilquínico já que os metabolitos achados no extrato de folhas pertencem a algum grupo deste ácido. Durante a pesquisa foi observado que alguns compostos eram conhecidos comercialmente, e se encontram com facilidade no mercado em uma alta pureza. Por esse motivo, foi decidido incorporar os ativos comerciais em sistemas liberação microparticulados e em micelas poliméricas, para posteriormente realizar ensaios antimicrobianos e estabelecer o potencial antifúngico frente às cepas dermatofíticas.

### 5.9 Obtenção das micropartículas por spray-drying

A secagem por spray é um dos métodos mais utilizados nos processos de microencapsulação, já que se requer de baixos custos para o processamento e permite usar uma ampla variedade de polímeros e fármacos tanto hidrofílicos quanto lipofílicos. De maneira geral os produtos encapsulados por spray-drying consistem em uma matriz homogênea misturada com polímeros, os quais atuam capturando ao fármaco ou ativo de interesse (PATEL; PATEL, 2010; POTHAKAMURY; BARBOSA-CÁNOVAS, 1995).

Para a preparação das micropartículas de quercetina e ácido 5-O-cafeoilquínico foi usado como polímero base, a quitosana por ser um composto que possui certas propriedades químicas que facilitam o processo de encapsulamento. Uma das características mais relevantes, é que este polímero é capaz de estabelecer ligações covalentes ou iônicas permitindo a formação de uma espécie de rede, onde a substância ativa ou fármaco permanece retida, trazendo muitas vantagens em termos de liberação controlada (ARAL & AKBUG, 1998; BERGER ET AL., 2004).

A obtenção de micropartículas esféricas de quitosana pelo método spray-drying podem sofrer algumas alterações devido à rápida evaporação da água pelo uso de altas temperaturas ou ao cisalhamento das gotículas gerado durante a fase de secagem (ALPAR et al., 2005; REYNAUD et al., 2011; VENTURA et al., 2008). Por esse motivo é importante realizar outros estudos de caracterização para verificar a morfologia, o tamanho e superfície das micropartículas, a fim de confirmar se as condições utilizadas no método são propícias para a realização de micropartículas com estrutura adequada para levar a cabo a liberação controlada e atingir o alvo de estudo.

Alguns dos fatores que podem interferir no processo de obtenção de micropartículas são os parâmetros de secagem (temperatura, pressão, taxa de alimentação, tipo de atomizador, potência do aspirador), assim como às formulações das suspensões (efeito de adição de ligante, tipo de dispersante,

proporção dos componentes, etc) (BERTRAND et al., 2003; GUJAR et al., 2007; WALTON; MUMFORD, 1999).

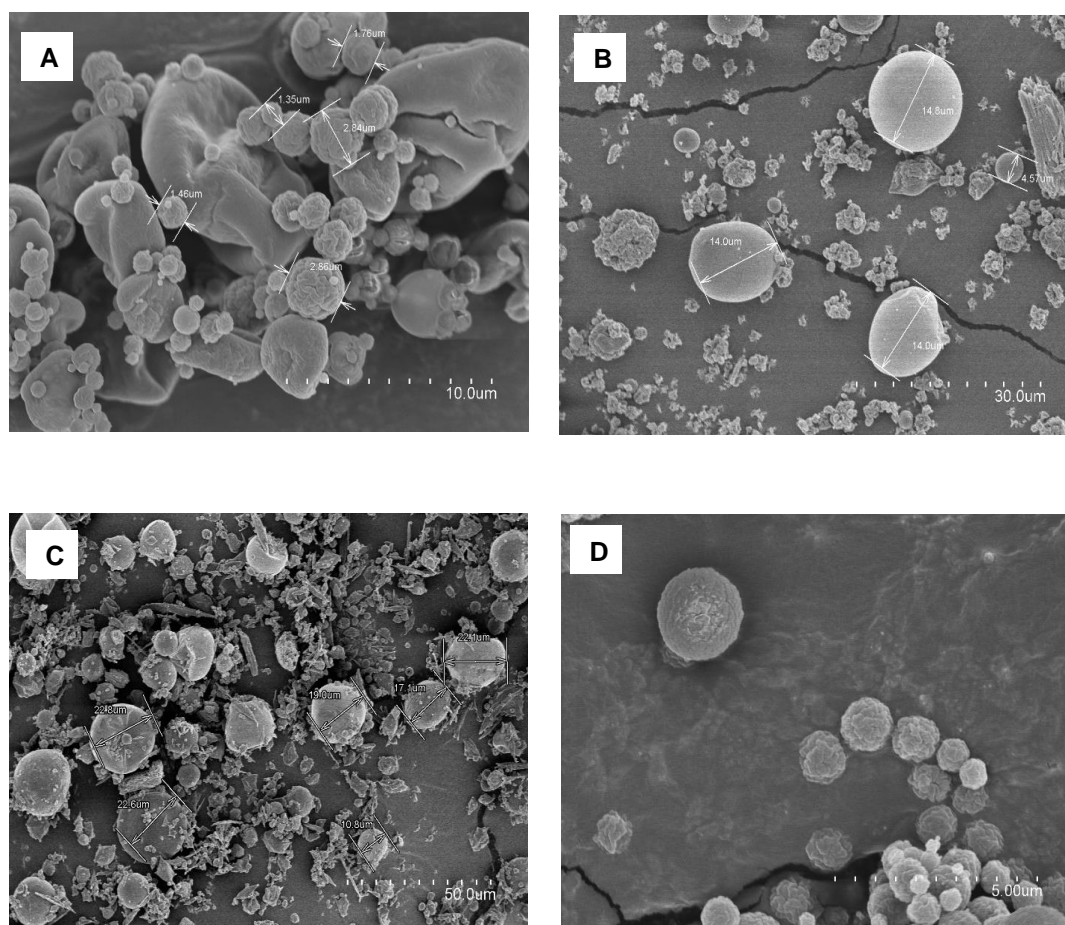
Nesta pesquisa, foram preparadas micropartículas de quercetina e ácido 5-O- cafeoilquínico, usando como polímeros quitosana e Tween® 80, este último foi acrescentado a fim de reduzir a tensão da superfície de contato e desta maneira facilitar a mistura com as moléculas de quitosana na matriz, modificando desta forma sua estrutura e conseguindo como resultado micropartículas com menos deformações (ALPAR et al., 2005; REYNAUD et al., 2011; VENTURA et al., 2008).

Também foram obtidas micropartículas de quercetina e ácido 5-O- cafeoilquínico com quitosana e o copolímero Soluplus®. Estudos tem demonstrado que este composto possui excelentes propriedades solubilizantes quando se trata de fármacos ou ativos pouco solúveis em água. Como o objetivo era incorporar a quercetina e o ácido 5-O- cafeoilquínico que são compostos lipossolúveis, a mistura de polímeros com hidrofobicidade diferente e sua adição de forma síncrona ajuda a melhorar a taxa de liberação, o que pode ser uma estratégia promissora para realizar uma liberação sustentada mantendo uma dissolução do sistema.

#### **5.10 Caracterização das micropartículas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A Figura 31 mostra as fotomicrografias das micropartículas de (A) Quitosana/Soluplus®/ ácido 5-O- cafeoilquínico, (B) Quitosana/Soluplus®/quercetina, (C) Quitosana/Tween® 80 / ácido 5-O- cafeoilquínico e (D) Quitosana/ Tween® 80 /quercetina obtidas por spray-drying. Como pode se observar todas as amostras apresentaram morfologias externas similares, a maioria delas são esféricas, e as micropartículas B, não apresentam fissuras ou porosidade aparente, com uma estrutura densa, um fator importante para assegurar uma proteção eficaz do material encapsulado. A distribuição do tamanho nas amostras foi determinada pela medição manual do diâmetro vertical e horizontal das partículas.

A distribuição de tamanho é um parâmetro relevante que permite descrever a polidispersibilidade das partículas pequenas, principalmente em amostras onde tamanhos de partículas menores são difíceis de medir e ocorre alguma agregação. Neste estudo, a distribuição de tamanho de partícula variou de 1,5-30  $\mu\text{m}$ .



**Figura 31.** Fotomicrografias A. Quitosana/Soluplus®/ácido 5-O- cafeoilquínico. B. Quitosana/Soluplus®/quercetina. C. Quitosana/ Tween® 80/ácido 5-O- cafeoilquínico. D. Quitosana/ Tween® 80/quercetina.

### 5.11 Obtenção de micelas poliméricas por hidratação de película finas

As micelas poliméricas tratassem de sistemas de associação coloidais constituídos por blocos de copolímeros anfifílicos, formados por um polímero hidrofílico e uma porção lipofílica (poliésteres, polianidridos e poliaminoácidos) (KESHARWANI et al., 2019). Neste estudo foi utilizado o Soluplus® por ser considerado um copolímero tri-bloco constituído por polivinilcaprolactama (PCL),

polivinilacetato (PVA) e polietilenoglicol (PEG). Sua composição permite que este promova a solubilidade de fármacos com baixa solubilidade aquosa (LINN, 2011).

Seu caráter bifuncional e seu poder solubilizante lhe permitem a formação de micelas ao entrar em contato com a água (SHAMMA; BASHA, 2013), permitindo que o fármaco lipofílico fique no interior da micela formada após o contato com o meio aquoso, evitando assim sua cristalização. Esta capacidade pode ser atribuída as interações entre o ativo e o polímero. Por exemplo, os grupos fenólicos do ativo podem interagir com o terminal -OH e o oxigênio do éter do Soluplus formando pontes de hidrogênio.

Devido à baixa solubilidade dos fármacos usados para este estudo (quercetina e ácido 5-O- cafeoilquínico), foram preparadas micelas contendo soluplus a fim de incorporar a funcionalidade em ambas as regiões do núcleo e da superfície: as moléculas hidrofóbicas e menos hidrofóbicas no núcleo, mas perto da “meia” hidrofílica (DESHMUKH et al., 2017). Além disso, por ser o Soluplus® um copolímero biodegradável e ter uma concentração total baixa como tensoativo permitiu que as micelas apresentassem melhor estabilidade mesmo após de sua diluição (DIAN et al., 2014; JIN et al., 2015).

### **5.12 Avaliação da atividade antimicrobiana o ácido 5-O- cafeoilquínico e a quercetina e as formulações incorporando estes ativos**

Na Tabela 18 estão representados os valores obtidos da CIM e CFM da QR e o AC, assim como também das formulações preparadas (QR1: Quitosana/Soluplus®/quercetina; QR2: Quitosana/Tween® 80/quercetina; QR3: Micelas de quercetina; AC1: Quitosana/ Soluplus®/ácido ácido 5-O- cafeoilquínico; AC2: Quitosana/Tween® 80/ ácido 5-O- cafeoilquínico; AC3: Micelas de ácido 5-O- cafeoilquínico) frente as diferentes cepas dermatofíticas.

**Tabela 18.** Valores de CIM e CFM dos ativos QR e AC e as formulações

<b>Concentração Inibitória Mínima CIM (µg/mL)</b>								
<b>Microrganismo<sup>a)</sup></b>	<b>QR</b>	<b>QR1</b>	<b>QR2</b>	<b>QR3</b>	<b>AC</b>	<b>AC1</b>	<b>AC2</b>	<b>AC3</b>
Tr1	312,50	156,50	78,13	156,5	78,13	312,50	625	625
Mc	156,10	78,13	19,53	78,13	78,13	625	625	312,5
Tr1 FOC	19,53	4,88	9,76	9,76	156,50	625	1250	625
Tm	625	156,50	19,53	156,50	312,50	312,50	312,50	625
<b>Concentração Fungicida Mínima CFM (µg/mL)</b>								
<b>Microrganismo<sup>a)</sup></b>	<b>QR</b>	<b>QR1</b>	<b>QR2</b>	<b>QR3</b>	<b>AC</b>	<b>AC1</b>	<b>AC2</b>	<b>AC3</b>
Tr1	312,50	156,50	78,13	312,5	156,50	312,50	1250	625
Mc	156,10	156,10	39,06	156,5	78,13	625	625	625
Tr1 FOC	39,06	4,88	19,53	39,03	156,50	625	1250	1250
Tm	625	156,50	39,06	312,5	312,50	625	625	625

<sup>a)</sup> Microrganismo: Tr1: *T. rubrum* isolado clínico; Mc: *M. canis*; Tr1 FOC: *T. rubrum* Fundação Osvlado Cruz; Tm: *T. mentagrophytes*. QR1: Quitosana/ Soluplus®/quercetina; QR2: Quitosana/Tween® 80/quercetina; QR3: Micelas de quercetina; AC1: Quitosana/ Soluplus®/ ácido 5-O- cafeoilquínico; AC2: Quitosana/Tween® 80/ ácido 5-O- cafeoilquínico; AC3: Micelas de ácido 5-O- cafeoilquínico.

Em geral, os resultados das CIM obtidos com as formulações com quercetina foram menores em comparação às CIM das culturas tratadas com formulações incorporando ácido 5-O- cafeoilquínico. Esses valores, também são menores que as CIM das cepas tratadas com extratos de folha e de flor. Além disso, os resultados demonstraram que as menores CIM obtidas foram frente as culturas de TR1 FOC (4,88 µg/mL e 9,76 µg/mL) tratadas com as micropartículas QR1: Quitosana/ Soluplus®/quercetina (4,88 µg/mL), micropartículas QR2: Quitosana/Tween® 80/quercetina (9,76 µg/mL) e micelas QR3 (9,76 µg/mL), valores que chegam a ser menores incluso que as concentrações obtidas para as cepas tratadas com quercetina pura (19,53 µg/mL). Por outro lado, pode-se inferir que o ácido 5-O- cafeoilquínico puro teve melhor atividade fungistática frente a todas as cepas dermatofíticas quando comparado com as formulações contendo o ácido e com os extratos brutos de folhas e flor.

### 5.13 Validação das metodologias analíticas para quantificação de quercetina e ácido 5-O- cafeoilquínico nos extratos brutos e nas formulações por HPLC/UV.

Para a validação I, correspondente a otimização do método analítico para quantificar QR e AC nos extratos de folhas e flores da *A. saturoioides*, foi usado um método cromatográfico desenvolvido em um LC/UV da Thermo® (C18, 250 × 4,6 mm, 5 µm). Da mesma forma foi feito com a validação II, onde se foi verificado um método para quantificar QR e AC nas formulações preparadas, além disso este método também seria usado para fazer o ensaio de tape-stripping na pele. Para isso, se planteou um método cromatográfico usando um LC-DAD/UV, Perkin Elmer Flexar®, (C18, 250 × 4,6 mm, 5 µm). As respostas para a validação dos métodos analíticos foram adquiridas a partir dos cromatogramas extraídos da QR (validação I: 13,4 min; validação II: 6,5 min) e AC (validação I:  $t_R$  de 3,3 min; validação II: 3,4 min). A condições cromatográficas utilizadas para ambos os métodos estão descritas no item 4.11.1

A validação I, usando um método analítico com acetonitrila demonstrou ser seletivo para a QR e o AC, isto se evidenciou já que após a análise de amostras branco não se observo a presença de nenhuma das substâncias, em comparação com as amostras LD (QR: 2,05 µg/mL; AC:1,75 µg/mL), além disso também não foram observados interferentes no tempo de retenção dos analitos, nem sinais dos compostos nos cromatogramas de amostras branco obtidos após 2 análises de amostras no LQ (QR: 3,08 µg/mL; AC:2,63 µg/mL), indicando que não houve efeito residual.

Por meio do teste de homoscedasticidade, considerando o índice de Cochran, os modelos aplicados nas análises em matriz acetonitrila foram considerados homocedásticos ( $C_{cal} < C_{tab}$ ), para a QR (0,42<0,56) e o AC (0,48<0,56).

A correlação linear entre as concentrações nominais e as áreas dos sinais analíticos ponderados ( $1/y^2$ ) gerou a equação  $y = 0,23182x - 0,00064$  ( $r = 0,9975$ ) para a QR e  $y = 0,73378x - 3,53137$  ( $r = 0,9991$ ) para o AC. Após análise de

variância (ANOVA) unilateral para um nível de confiança de 95% foi possível constatar que os modelos de regressão linear foram estatisticamente significativos dentro do intervalo de confiança ( $F_{cal} > F_{tab}$ , P valor  $< 0,05$ ) e que ele descreve adequadamente os dados experimentais ( $F_{cal} < F_{tab}$ , P valor  $> 0,05$ ), confirmando que não há falta de ajuste e que o modelo está adequado (BRASIL, 2017).

Os resultados de precisão e exatidão referentes aos controles de qualidade da curva analítica construída a partir da resposta de cada concentração de QR e AC estão apresentadas nas Tabelas 19 e 20. Os valores foram aceitáveis, pois ficaram entre o limite de  $\pm 15\%$  em relação ao valor de concentração nominal (BRASIL, 2017)

**Tabela 19.** Exatidão e precisão do método analítico com QR F (n = 3).

Concentração nominal ( $\mu\text{g/mL}$ )	Intra-corrída			Inter-corrída		
	Concentração calculada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Precisão (CV%)	Exatidão (EPR)	Concentração calculada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Precisão (CV%)	Exatidão (EPR)
QR 12,5	12,929	0,5	3,4	13,287	6,621	6,300
75	75,5364	3,8	0,7	76,420	3,710	1,893
200	204,896	5,8	2,4	199,107	0,534	-0,446

**Tabela 20.** Exatidão e precisão do método analítico com AC F (n = 3).

Concentração nominal ( $\mu\text{g/mL}$ )	Intra-corrída			Inter-corrída		
	Concentração calculada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Precisão (CV%)	Exatidão (EPR)	Concentração calculada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Precisão (CV%)	Exatidão (EPR)
AC 12,5	13,403	0,8	7,2	12,222	9,871	-2,221
75	75,668	8,7	0,8	76,158	1,407	1,544
200	204,610	5,3	2,3	202,227	3,485	1,113

Na validação II, a fim de estabelecer o grau de concordância e a repetibilidade dos resultados foram realizadas várias réplicas que forneceram um desvio padrão relativo de 0,38% para a QR e 0,64% para o AC, demonstrando concordância os dados obtidos com o mesmo analista e mesma instrumentação.

Também foi determinada a precisão entre analistas, obtendo-se um DPR% de 0,80% (QR) e 0,54% (AC) para o segundo analista. O teste F demonstrou que não houve diferença significativa entre os valores de absorvância encontrados entre os dois analistas,  $F_{cal}$  QR: 0,14 e  $F_{cal}$  AC: 0,7 (AC), comprovando a precisão intermediária do método proposto, frente ao parâmetro avaliado, conforme apresentado nas Tabelas 21 e 22.

**Tabela 21.** Valores das áreas referentes ao pico de QR no estudo da repetibilidade e precisão intermediária do método

<b>Quercetina</b>								
100µg/mL	<b>Area 1</b>	<b>Area 2</b>	<b>Area 3</b>	<b>Area 4</b>	<b>Area 5</b>	<b>Area 6</b>	<b>Média</b>	<b>DPR%</b>
Analista 1	11668417,9	11551494,3	11613029,7	11650728,9	11663895,1	11599740,3	11624550,9	0,38
Analista 2	11563902,7	11403964,5	11426297,1	11636648,4	11636648,4	11594197,8	11523815,1	0,80

\*DPR%: Porcentagem Desvio Padrão Relativo

**Tabela 22.** Valores das áreas referentes ao pico de AC no estudo da repetibilidade e precisão intermediária do método

<b>Ácido 5-O- cafeoilquínico</b>								
100µg/mL	<b>Area 1</b>	<b>Area 2</b>	<b>Area 3</b>	<b>Area 4</b>	<b>Area 5</b>	<b>Area 6</b>	<b>Média</b>	<b>DPR%</b>
Analista 1	6528918,1	6550435,4	6459304,8	6587035,5	6532690,0	6548632,1	6534502,6	0,64
Analista 2	6584973,2	6587412,3	6514987,3	6523669,1	6518976,3	6578856,1	6551479,1	0,54

\*DPR%: Porcentagem Desvio Padrão Relativo

A correlação linear entre as concentrações nominais e as áreas dos sinais analíticos ponderados ( $1/y^2$ ) gerou a equação  $y = 103732x + 222002$  ( $r = 0,9994$ ) para a QR e  $y = 67804x + 119319$  ( $r = 0,9999$ ) para o AC. Após análise de variância (ANOVA) unilateral para um nível de confiança de 95% foi possível constatar que os modelos de regressão linear foram estatisticamente significativos dentro do intervalo de confiança ( $F_{cal} > F_{tab}$ , P valor  $< 0,05$ ) descrevendo os dados experimentais ( $F_{cal} < F_{tab}$ , P valor  $> 0,05$ ), confirmando que não há falta de ajuste indicando uma boa correlação linear entre os dados analisados (BRASIL, 2017).

A exatidão do método analítico foi determinada considerando a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (BRASIL, 2003). Para isto, concentrações conhecidas de QR e AC, denominadas concentrações teóricas, foram analisadas a 256 nm e 330nm respectivamente e, por meio da equação obtida no ensaio de linearidade, as concentrações experimentais foram calculadas. Em seguida, a exatidão do método foi determinada segundo a ANVISA (2003), como apresentado na Tabelas 23.

**Tabela 23.** Avaliação da exatidão do método analítico de quantificação de QR e AC por HPLC/UV-vis.

QR				
Concentração teórica ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentração Experimental 1 ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentração Experimental 2 ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentração Experimental 3 ( $\mu\text{g/mL}$ )	Exatidão
5	4,27	4,28	4,24	85,19
100	109,34	107,80	108,01	108,38
500	496,69	496,35	496,54	99,30

AC				
Concentração teórica ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentração Experimental 1 ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentração Experimental 2 ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentração Experimental 3 ( $\mu\text{g/mL}$ )	Exatidão
5	4,98	5,05	4,72	98,31

100	94,53	94,84	93,50	94,29
500	502,02	508,34	501,43	100,78

De acordo com os valores obtidos, concluiu-se que o método é preciso, uma vez que não houve variações maiores que 5% entre as concentrações teóricas e as concentrações experimentais obtidas nos ensaios realizados (BRASIL, 2003).

A robustez também foi avaliada, modificando-se a taxa de fluxo da fase móvel, comprimento de onda, e o volume de injeção. Os valores do teor obtidos após estas modificações não apresentaram valores de desvio padrão relativo (DPR) maiores que 5%. Os resultados mostraram que o método é robusto, já que pequenas alterações no método utilizado não provocaram variações significativas nos resultados obtidos, como mostram as Tabelas 24 e 25.

**Tabela 24.** Valores de robustez obtidos pelo método HPLC-UV-vis para análise de QR

Variável	Faixa investigada	Concentração calculada (µg/mL)	DPR %
Comprimento de onda (nm)	253	109,74	0,60
Taxa de fluxo fase móvel (mL/min)	255	109,06	
	0,80	109,57	1,06
	1,0	110,48	
Volume de injeção	10	108,60	1,95
	30	112,32	

**Tabela 25.** Valores de robustez obtidos pelo método HPLC-UV-vis para análise de AC.

Variável	Faixa investigada	Concentração calculada ( $\mu\text{g/mL}$ )	DPR %
Comprimento de onda (nm)	253	93,88	0,71
	255	94,32	
Taxa de fluxo fase móvel (mL/min)	0,80	94,57	0,37
	1,0	94,99	
Volume de injeção	10	95,31	2,78
	30	95,63	

Finalmente, aplicando a equação 5 e com os valores mostrados na Tabela 26 foram encontradas as concentrações mínimas que os métodos analíticos são capazes de detectar são  $0,33 \mu\text{g/mL}$  para a QR e  $0,46 \mu\text{g/mL}$  para o AC.

**Tabela 26.** Determinação dos limites de detecção e de quantificação de quercetina e ácido 5-O- cafeoilquínico por HPLC-UV-vis.

Curvas	Quercetina		Ácido 5-O- cafeoilquínico	
	Intercepção com o eixo Y	Inclinação da curva analítica	Intercepção com o eixo Y	Inclinação da curva analítica
1	219641	103600	98046	67813
2	212176	104161	93606	67859
3	220421	103737	77994	68503
Media	217413	103833	89882	68058
DP	4552,82	292,48	10531,94	385,87

Aplicando os valores apresentados na Tabela 26 na equação 6, foi encontrado que as concentrações mínimas que os métodos analíticos são capazes de quantificar são  $0,44 \mu\text{g/mL}$  para a QR e  $1,54 \mu\text{g/mL}$  para o AC.

Uma vez validados os métodos, se procedeu a calcular a percentagem de QR presente no extrato de flores, nas micropartículas QR1: Quitosana/Soluplus®/quercetina e QR2: Quitosana/Tween® 80/quercetina e nas micelas com quercetina QR3, da mesma forma se calculou a percentagem de ácido 5-O-cafeoilquínico no extrato de folhas, nas micropartículas AC1: Quitosana/Soluplus®/ácido 5-O-cafeoilquínico e AC2: Quitosana/Tween® 80/ácido 5-O-cafeoilquínico e nas micelas com ácido 5-O-cafeoilquínico AC3, para isso foram usadas as equações das curvas analíticas obtidas para cada método. Os valores estão apresentados nas Tabelas 27 e 28:

**Tabela 27.** Percentagem de ácido 5-O-cafeoilquínico presentes no extrato de folhas e nas formulações

<b>Amostra</b>	<b>% ácido 5-O-cafeoilquínico</b>
Extrato de folhas	11,92
AC1	33,37
AC2	25,63
AC3	23,98

**Tabela 28.** Percentagem de quercetina presentes no extrato de flores e nas formulações

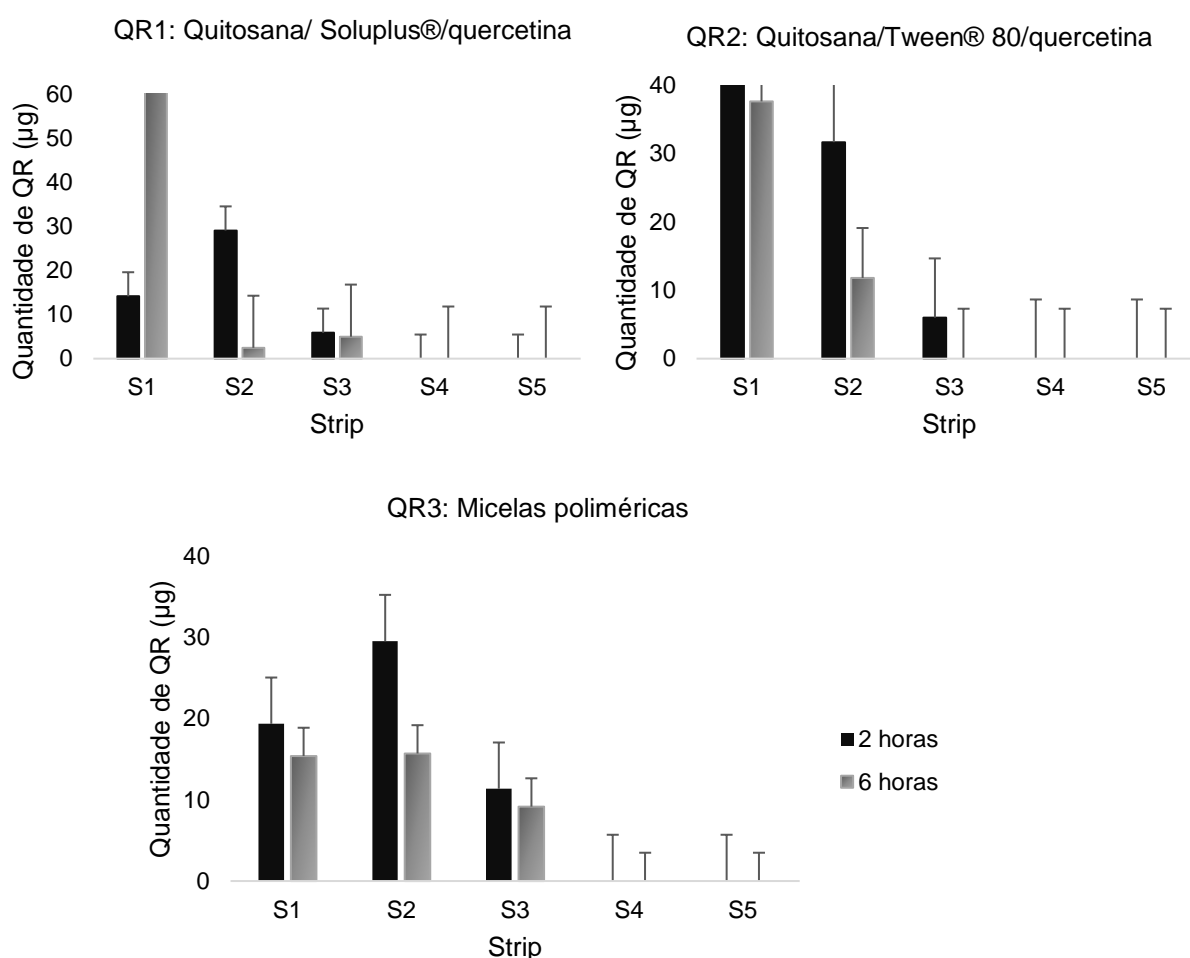
<b>Amostra</b>	<b>% quercetina</b>
Extrato de flores	1,31
QR1	9,01
QR2	19,47
QR3	14,54

#### **5.14. Estudos de penetração em pele humana: *Tape Stripping***

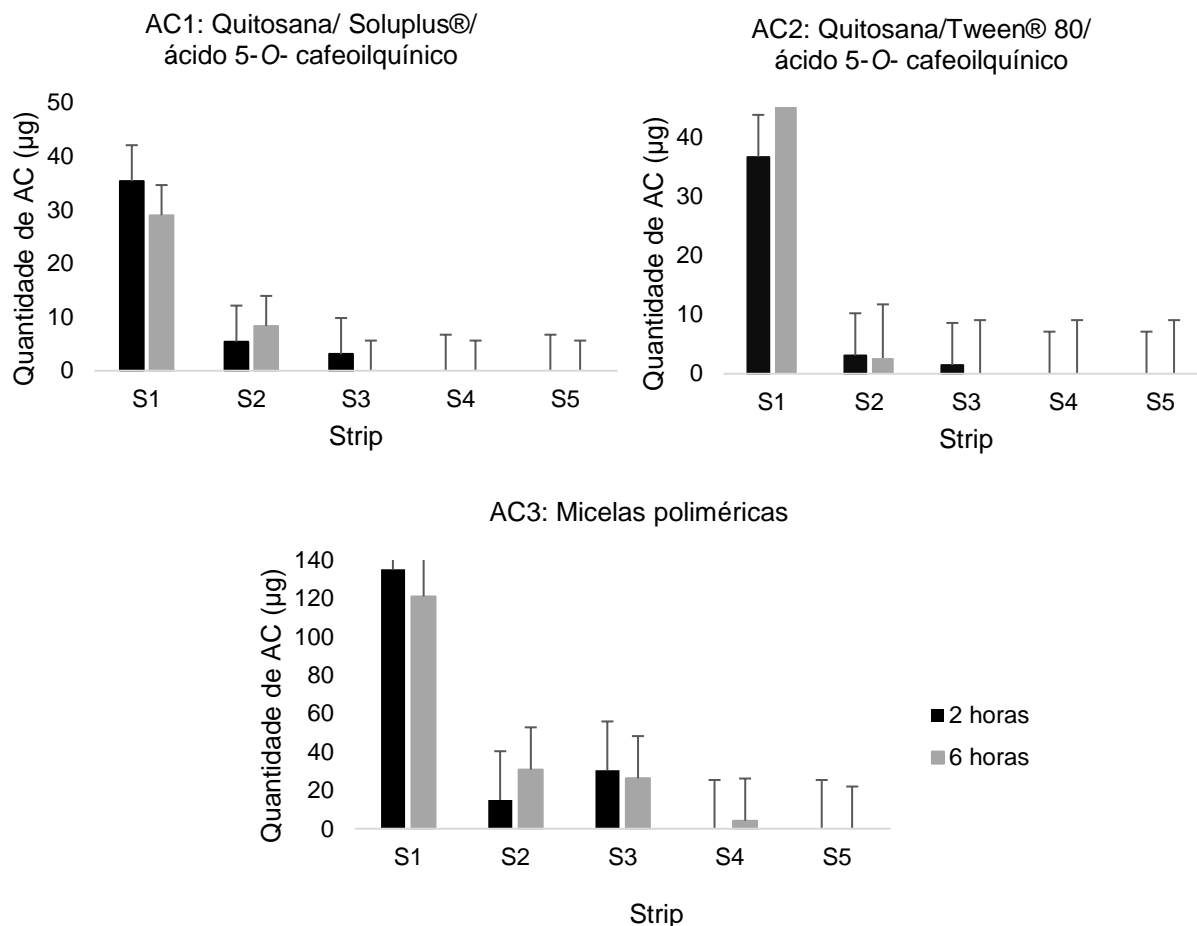
A penetração das formulações contendo QR e AC em pele humana foram estudadas, com base à técnica da remoção progressiva das camadas de estrato córneo por decapagem sequencial com fitas adesivas (JACOBI et al., 2005). A

quantidade de QR e AC transferida para as fitas adesivas individuais após a aplicação tópica das formulações foram quantificadas para fornecer o perfil de penetração dos ativos no estrato córneo. Os perfis achados para cada substância após um período de incubação de 2 e 6 h do contato com as formulações QR1: Quitosana/ Soluplus®/quercetina; QR2: Quitosana/Tween® 80/quercetina; QR3: Micelas de quercetina; AC1: Quitosana/ Soluplus®/ ácido 5-O- cafeoilquínico; AC2:

Quitosana/Tween® 80/ ácido 5-O- cafeoilquínico; AC3: Micelas de ácido 5-O- cafeoilquínico) estão apresentadas nas Figuras 32 e 33.



. **Figura 32.** Penetração de QR no estrato córneo após 2h e 6h de aplicação das formulações QR1, QR2 e QR3



**Figura 33.** Penetração de AC no estrato córneo após 2h e 6h de aplicação das formulações AC1, AC2 e AC3.

Geralmente nos ensaios de tape stripping a primeira tira é descartada, pois na superfície da pele fica um excesso da formulação, porém neste caso a quantidade de ativo presente no strip 1 (S1) foi considerado para realizar a contagem total de QR e AC. As tiras tiveram que ser coletadas e extraídas em grupos porque a quantidade de drogas presentes em cada tira é baixa e, após diluição no meio de extração, as concentrações foram muito próximas do limite de detecção, desta forma foi possível garantir a quantificação.

Como se observa na Figura 32, a quantidade QR, na pele tratada com as formulações QR2 e QR3 foi maior após 2 horas que depois de 6 horas de

tratamento (S1, S2 e S3). Por outro lado, a pele que esteve em contato com a formulação QR1, demonstrou que após 6 horas de contato com a solução, a maior quantidade de QR ficou retida no strip 1, indicando que o ativo foi capaz de penetrar o estrato córneo, porém ficou nas camadas mais superficiais. Após 2 horas de tratamento com a formulação QR3, pode ser apreciado que a maior profundidade do estrato córneo a quantidade de QR é maior no S2. De acordo com os resultados é possível inferir que as formulações foram capazes de penetrar o estrato córneo, porém não conseguiu atingir as camadas mais profundas, já que em geral os ativos ficaram retidos nas camadas superficiais da pele.

A Figura 33, representa o perfil de penetração das formulações com AC. Como se observa nos três casos, a maior quantidade de AC, foi encontrada no primeiro strip após 2 e 6 horas de tratamento. Independente do tempo de tratamento a quantidade de AC no S2 e S3 foi semelhante.

Comparando os perfis de penetração no estrato córneo, é possível afirmar que as formulações onde foi incorporada a quercetina, apresentaram melhor capacidade de penetração no estrato córneo que as formulações com ácido 5-O-cafeoilquínico após 2 e 6 horas de tratamento.

## 6. CONCLUSÕES

Extratos de folhas e flores da *A. saturoiodes* são agentes fungicidas e fungistáticos frente a diferentes cepas de dermatófitos, devido a sua capacidade de inibir e eliminar o crescimento das células em todas as cepas dermatofíticas.

O mecanismo de ação dos extratos de flores frente às cepas dermatofíticas, pode estar relacionado à membrana plasmática, devido a sua capacidade de complexação com o ergosterol evidenciada pelo aumento das CIM em presença de ergosterol exógeno e também pela inibição da biossíntese de ergosterol.

Para o extrato de folhas, é possível sugerir que sua atividade antifúngica pode estar associada à interação com a parede celular demonstrado pelo aumento das CIM em presença do estabilizante osmótico sorbitol.

No estudo por microscopia confocal usando CW, foi demonstrado que os extratos de folhas e flores foram capazes de alterar a estrutura e o comprimento das paredes das hifas quando comparado com as culturas controle. Pela mesma técnica usando o fluorocromo VN, foi evidenciada a perda de corpos lipídicos nas cepas dermatofíticas.

Os dois extratos demonstraram apresentar capacidade antioxidante, porém comparando os valores de concentração efetiva é possível afirmar que o extrato de flores apresenta melhor potencial antioxidante que o extrato de folhas.

A citotoxicidade *in vitro*, demonstrou que os extratos em determinadas concentrações, podem afetar a viabilidade celular das células HaCat e HepG2. Entretanto, frente às células humanas do epitélio alveolar basal A549, foi demonstrado que estes não são citotóxicos.

A análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas estabeleceu que os compostos majoritários no extrato de flores são a quercetina e a 3-O-metil-quercetina e no extrato de folhas o ácido 5-O-cafeoilquínico.

As formulações contendo quercetina e ácido 5-O-cafeoilquínico demonstraram ter melhor potencial antifúngico que os extratos brutos de folhas e flores.

As formulações contendo quercetina apresentaram melhor potencial antifúngico que as formulações com ácido 5-O- cafeoilquínico, principalmente frente à cepa de Tr1 FOC.

As formulações contendo quercetina e ácido 5-O-cafeoilquínico foram capazes de penetrar o estrato córneo, sendo que aquelas contendo quercetina, apresentaram melhor capacidade de penetração.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABRANCHES, S. Biological megadiversity as a tool of soft power and development for Brazil. **Brazilian Political Science Review**, [s. l.], v. 14, n. 2, 2020.
- ACHTERMAN, R. R.; WHITE, T. C. A foot in the door for dermatophyte research. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 8, n. 3, 2012.
- AHMED, S.; RATHER, S.; KOUSAR, H.; BUKHARI, S. Tinea capitis in adults: not so rare. **International Journal of Research in Medical Sciences**, [s. l.], 2016.
- AL HASAN, M.; FITZGERALD, S. M.; SAOUDIAN, M.; KRISHNASWAMY, G. Dermatology for the practicing allergist: Tinea pedis and its complications. **Clinical and Molecular Allergy**, [s. l.], v. 2, n. 1, 2004.
- ALPAR, H.; SOMAVARAPU, S.; ATUAH, K.; BRAMWELL, V. Biodegradable mucoadhesive particulates for nasal and pulmonary antigen and DNA delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 57, n. 3, 2005.
- ALVES, F.; RECALCATI, S.; LEIMAN, C.; TEIXEIRA, M. Avaliação da citotoxicidade de extratos da planta *Baccharis coridifolia*, Mostra Nacional de Iniciação Científica, Tecnológica e Disciplinar, 2015.
- ANAND, K.; TILOKE, C.; NAIDOO, P.; CHUTURGOON, A. A. Phytonanotherapy for management of diabetes using green synthesis nanoparticles. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [s. l.], v. 173, 2017.
- ANKRI, S.; MIRELMAN, D. Antimicrobial properties of allicin from garlic. **Microbes and Infection**, [s. l.], v. 1, n. 2, 1999.
- ARAÚJO, C. A.; MORGADO, C. S.; GOMES, A. K. C.; GOMES, A. C. C.; SIMAS, N. K. Asteraceae family: a review of its allelopathic potential and the case of *Acmella oleracea* and *Sphagneticola trilobata*. **Rodriguésia**, [s. l.], v. 72, 2021.
- ARENAS, R. **Micología Médica Ilustrada**. Cuarta Edición ed. [s.l: s.n.].

ARIF, T.; BHOSALE, J. D.; KUMAR, N.; MANDAL, T. K.; BENDRE, R. S.; LAVEKAR, G. S.; DABUR, R. Natural products – antifungal agents derived from plants. **Journal of Asian Natural Products Research**, [s. l.], v. 11, n. 7, 2009.

ARREDONDO, M. F.; BLASINA, F.; ECHEVERRY, C.; MORQUIO, A.; FERREIRA, M.; ABIN-CARRIQUIRY, J. A.; LAFON, L.; DAJAS, F. Cytoprotection by *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. and some of its main flavonoids against oxidative stress. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 91, n. 1, 2004.

ARTHINGTON-SKAGGS, B. A.; LEE-YANG, W.; CIBLAK, M. A.; FRADE, J. P.; BRANDT, M. E.; HAJJEH, R. A.; HARRISON, L. H.; SOFAIR, A. N.; WARNOCK, And D. W. Comparison of visual and spectrophotometric methods of broth microdilution mic end point determination and evaluation of a sterol quantitation method for in vitro susceptibility testing of fluconazole and itraconazole against trailing and nontrailing *Candida* Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 46, n. 8, 2002.

BACHHAV, Y. G.; MONDON, K.; KALIA, Y. N.; GURNY, R.; MÖLLER, M. Novel micelle formulations to increase cutaneous bioavailability of azole antifungals. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 153, n. 2, 2011.

BAERT, F.; STUBBE, D.; D'HOOGHE, E.; PACKEU, A.; HENDRICKX, M. Updating the taxonomy of dermatophytes of the BCCM/IHEM collection according to the new standard: A phylogenetic approach. **Mycopathologia**, [s. l.], 2019.

BALAKUMAR, S.; RAJAN, S.; THIRUNALASUNDARI, T.; JEEVA, S. Epidemiology of dermatophytosis in and around Tiruchirapalli, Tamilnadu, India. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, [s. l.], v. 2, n. 4, 2012.

BALEEIRO, R. B.; WIESMÜLLER, K.-H.; REITER, Y.; BAUDE, B.; DÄHNE, L.; PATZELT, A.; LADEMANN, J.; BARBUTO, J. A.; WALDEN, P. Topical Vaccination with Functionalized Particles Targeting Dendritic Cells. **Journal of Investigative Dermatology**, [s. l.], v. 133, n. 8, 2013.

BARAN, R.; FEUILHADE, M.; DATRY, A.; GOETTMANN, S.; PIETRINI, P.; VIGUIE, C.; BADILLET, G.; LARNIER, C.; CZERNIELEWSKI, J. A randomized trial

of amorolfine 5% solution nail lacquer combined with oral terbinafine compared with terbinafine alone in the treatment of dermatophytic toenail onychomycoses affecting the matrix region. **British Journal of Dermatology**, [s. l.], v. 142, n. 6, 2000.

BARBOSA BRASILEIRO, C.; BENVINDO FERREIRA, S.; MARANHÃO DINIZ, B.; SOUSA ALCÂNTARA, D.; DA SILVA TENÓRIO, T.; SOARES FEITOSA, L. Domestic cat (*Felis catus*) as a transmission link for dermatophytosis by *Microsporium canis* to humans– case report. **Journal of Veterinary Science and Public Health**, [s. l.], v. 7, p. 136–145, 2020.

BAUER, A.; BRÖNSTRUP, M. Industrial natural product chemistry for drug discovery and development. **Nat. Prod. Rep.**, [s. l.], v. 31, n. 1, 2014.

BAUMGARDNER, D. J. Fungal Infections From Human and Animal Contact. **Journal of Patient-Centered Research and Reviews**, [s. l.], v. 4, n. 2, 2017.

BEGUM, J.; MIR, N. A.; LINGARAJU, M. C.; BUYAMAYUM, B.; DEV, K. Recent advances in the diagnosis of dermatophytosis. **Journal of Basic Microbiology**, [s. l.], v. 60, n. 4, 2020.

BERG, D.; ERICKSON, P. Fungal skin infections in children. **Postgraduate Medicine**, [s. l.], v. 110, n. 1, 2001.

BERTRAND, G.; FILIATRE, C.; MAHDJOUR, H.; FOISSY, A.; CODDET, C. Influence of slurry characteristics on the morphology of spray-dried alumina powders. **Journal of the European Ceramic Society**, [s. l.], v. 23, n. 2, 2003.

BIASI-GARBIN, R. P.; DEMITTO, F. de O.; AMARAL, R. C. R. Do; FERREIRA, M. R. A.; SOARES, L. A. L.; SVIDZINSKI, T. I. E.; BAEZA, L. C.; YAMADA-OGATTA, S. F. Antifungal potential of plant species from brazilian caatinga against dermatophytes. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [s. l.], v. 58, n. 0, 2016.

BILA, N. M.; COSTA-ORLANDI, C. B.; VASO, C. O.; BONATTI, J. L. C.; DE ASSIS, L. R.; REGASINI, L. O.; FONTANA, C. R.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.;

MENDES-GIANNINI, M. J. S. 2-Hydroxychalcone as a potent compound and photosensitizer against dermatophyte biofilms. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 11, 2021.

BITENCOURT, T. A.; KOMOTO, T. T.; MASSAROTO, B. G.; MIRANDA, C. E. S.; BELEBONI, R. O.; MARINS, M.; FACHIN, A. L. Trans-chalcone and quercetin down-regulate fatty acid synthase gene expression and reduce ergosterol content in the human pathogenic dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], v. 13, n. 1, 2013.

BLOIS, H. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, [s. l.], v. 181, p. 1199–1200, 1958.

BOECK, P.; LEAL, P. C.; YUNES, R. A.; FILHO, V. C.; LÓPEZ, S.; SORTINO, M.; ESCALANTE, A.; FURLÁN, R. L. E.; ZACCHINO, S. Antifungal activity and studies on mode of action of novel xanthoxylone-derived chalcones. **Archiv der Pharmazie**, [s. l.], v. 338, n. 2–3, 2005.

BONIFAZ, A.; CÓRDOBA-GARCÍA, B.; SIMANCAS-LLANOS, T.; HERNÁNDEZ, M. A.; MARTÍNEZ-HERRERA, E.; TIRADO-SÁNCHEZ, A. Dermatophytosis caused by *Nannizzia nana* in two siblings. **Revista Iberoamericana de Micología**, [s. l.], v. 36, n. 1, 2019.

BONIFAZ, J. **Micología Médica Básica**. 5ta. Edición ed. [s.l: s.n.].

BOREN, J.; BRINDLE, K. M. Apoptosis-induced mitochondrial dysfunction causes cytoplasmic lipid droplet formation. **Cell Death & Differentiation**, [s. l.], v. 19, n. 9, 2012.

BOSCOLO, O. H.; VALLE, L. de S. Plantas de uso medicinal em Quissamã, Rio de Janeiro, Brasil. **Iheringia, Série Botânica**, [s. l.], v. 63, n. 2, 2008.

BRACA, A.; SORTINO, C.; POLITI, M.; MORELLI, I.; MENDEZ, J. Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 79, n. 3, 2002.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 28, n. 1, 1995.

BRASCH, J.; BECK-JENDROSCHEK, V.; VOSS, K.; YURKOV, A.; GRÄSER, Y. *Arthroderma chiloniense* sp. nov. isolated from human stratum corneum: Description of a new *Arthroderma* species. **Mycoses**, [s. l.], v. 62, n. 1, 2019.

BRASIL. Resolução da diretoria colegiada - RDC nº 27, de 27 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. In: MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. (Ed.). [s.l.: s.n.].

BRASIL. Diário Oficial da União. In: **Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. [s.l.] : Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária., 2017.

BREMER, K.; ANDERBERG, A. **Asteraceae- Cladistics and Classification**. [s.l.: s.n.].

BROUSSALIS, A. M.; FERRARO, G. E.; GURNI, A.; COUSSIO, J. D. Phenolic constituents of four *Achyrocline* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, [s. l.], v. 16, n. 4, 1988.

BUENO, P. C. P.; PEREIRA, F. M. V.; TORRES, R. B.; CAVALHEIRO, A. J. Development of a comprehensive method for analyzing clerodane-type diterpenes and phenolic compounds from *Casearia sylvestris* Swartz (Salicaceae) based on ultra high performance liquid chromatography combined with chemometric tools. **Journal of Separation Science**, [s. l.], v. 38, n. 10, 2015.

CABAÑES, F. J. Dermatophytes: The names they are a-changin'. **Revista Iberoamericana de Micología**, [s. l.], v. 37, n. 1, 2020.

CACERES, A.; LOPEZ, B. R.; GIRON, M. A.; LOGEMANN, H. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 1. Screening for

antimycotic activity of 44 plant extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 31, n. 3, 1991.

CAGEL, M.; TESAN, F. C.; BERNABEU, E.; SALGUEIRO, M. J.; ZUBILLAGA, M. B.; MORETTON, M. A.; CHIAPPETTA, D. A. Polymeric mixed micelles as nanomedicines: Achievements and perspectives. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 113, 2017.

CALVO, D.; CARIDDI, L. N.; GROSSO, M.; DEMO, M. S.; MALDONADO, A. M. *Achyrocline satureioides* (LAM.) DC (Marcela): antimicrobial activity on *Staphylococcus* spp. and immunomodulating effects on human lymphocytes. **Revista latinoamericana de microbiologia**, [s. l.], v. 48, n. 3–4, 2006.

CANTELLI, B. A. M.; BITENCOURT, T. A.; KOMOTO, T. T.; BELEBONI, R. O.; MARINS, M.; FACHIN, A. L. Caffeic acid and licochalcone A interfere with the glyoxylate cycle of *Trichophyton rubrum*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 96, 2017.

CARINI, J.; LEITAO, G.; SCHNEIDER, P.; SANTOS, C.; COSTA, F.; HOLZSCHUH, M.; KLAMT, F.; BASSANI, V. Isolation of Achyrobichalcone from *Achyrocline satureioides* by High- Speed Countercurrent Chromatography. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, [s. l.], v. 16, n. 1, 2015. a.

CARINI, J.; LEITAO, G.; SCHNEIDER, P.; SANTOS, C.; COSTA, F.; HOLZSCHUH, M.; KLAMT, F.; BASSANI, V. Isolation of Achyrobichalcone from *Achyrocline satureioides* by high- speed countercurrent chromatography. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, [s. l.], v. 16, n. 1, 2015. b.

CARINI, J. P.; KLAMT, F.; BASSANI, V. L. Flavonoids from *Achyrocline satureioides*: promising biomolecules for anticancer therapy. **RSC Adv.**, [s. l.], v. 4, n. 7, 2014.

CAROLINA OLIVEIRA DOS SANTOS, L.; SPAGNOL, C. M.; GUILLOT, A. J.; MELERO, A.; CORRÊA, M. A. Caffeic acid skin absorption: Delivery of microparticles to hair follicles. **Saudi Pharmaceutical Journal**, [s. l.], v. 27, n. 6, 2019.

CARON, D.; QUEILLE-ROUSSEL, C.; SHAH, V. P.; SCHAEFER, H. Correlation between the drug penetration and the blanching effect of topically applied hydrocortisone creams in human beings. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [s. l.], v. 23, n. 3, 1990.

CASERO, C.; MACHÍN, F.; MÉNDEZ-ÁLVAREZ, S.; DEMO, M.; RAVELO, Á. G.; PÉREZ-HERNÁNDEZ, N.; JOSEPH-NATHAN, P.; ESTÉVEZ-BRAUN, A. Structure and antimicrobial activity of phloroglucinol derivatives from *Achyrocline satureioides*. **Journal of Natural Products**, [s. l.], v. 78, n. 1, 2015.

CERVERA, A.; MAESTRE, J.; MORENO, R. Consumo de antifúngicos de uso tópico en España. **Rev. Esp. Quimioterapia**, [s. l.], v. 14, p. 340–344, 2001.

CHIACCHIO, N. Di; MADEIRA, C. L.; HUMAIRE, C. R.; SILVA, C. S.; FERNANDES, L. H. G.; REIS, A. L. Dos. Superficial mycoses at the Hospital do Servidor Público Municipal de São Paulo between 2005 and 2011. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [s. l.], v. 89, n. 1, 2014.

CLIFFORD, M. N.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MS <sup>n</sup>. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 53, n. 10, 2005.

CLSI. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. In: Approved standard, 3rd ed; CLSI DOCUMENT M38-A3, C. (Eds.). **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi**. Wayne, PA .

COHEN, E. Chitin synthesis and degradation as targets for pesticide action. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, [s. l.], v. 22, n. 1–2, 1993.

CORRÊA, B.; JANE, M.; AVANCINI, M.; AUGUSTO, C.; SAPNIOL, B. Atividade desinfetante anti-*Staphylococcus aureus* meticilina resistentes e compostos flavonóides em *Achyrocline satureioides* Lam. (macela) / Actividad desinfectante anti-*Staphylococcus aureus* meticilina resistentes y compuestos flavonoides en *Achyrocline satureioides* Lam. (macela) / Disinfectant activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and flavonoid compounds in *Achyrocline satureioides* Lam. (macela). **Rev. cuba. plantas med** , [s. l.], v. 21, n. 4, 2016.

COSENTINO, M.; BOMBELLI, R.; CARCANO, E.; LUINI, A.; MARINO, F.; CREMA, F.; DAJAS, F.; LECCHINI, S. Immunomodulatory properties of *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. infusion: A study on human leukocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 116, n. 3, 2008.

COSTA-ORLANDI, C. B.; MARTINEZ, L. R.; BILA, N. M.; FRIEDMAN, J. M.; FRIEDMAN, A. J.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; NOSANCHUK, J. D. Nitric oxide-releasing nanoparticles are similar to efinaconazole in their capacity to eradicate *Trichophyton rubrum* biofilms. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 11, 2021.

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal of Mass Spectrometry**, [s. l.], v. 39, n. 1, 2004.

DABUR, R.; SINGH, H.; CHHILLAR, A. K.; ALI, M.; SHARMA, G. L. Antifungal potential of Indian medicinal plants. **Fitoterapia**, [s. l.], v. 75, n. 3–4, 2004.

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, [s. l.], v. 23, n. 2, 2012.

DAVEL, G. Curso a distancia y taller de Diagnóstico de Micosis Superficiales. Servicio de Micosis Superficiales. In: (I. N. de E. I. Departamento Micología, Ed.) 2009, **Anais...** [s.l: s.n.]

DE ANDRADE MONTEIRO, C.; RIBEIRO ALVES DOS SANTOS, J. Phytochemicals and their antifungal potential against pathogenic yeasts. In: **Phytochemicals in Human Health**. [s.l.] : IntechOpen, 2020.

DE GONZÁLEZ, M.; MENDOZA, M.; DE ALBORNOZ, M.; APITZ-CASTRO, R. Efectos del ajoeno sobre dermatofitos, *Candida albicans* y *Malassezia furfur*. **Rev Iberoam Micol**, [s. l.], v. 15, p. 277–281, 1998.

DE HOOG, G. S.; DUKIK, K.; MONOD, M.; PACKEU, A.; STUBBE, D.; HENDRICKX, M.; KUPSCH, C.; STIELOW, J. B.; FREEKE, J.; GÖKER, M.; REZAEI-MATEHKOLAEI, A.; MIRHENDI, H.; GRÄSER, Y. Toward a novel

multilocus phylogenetic taxonomy for the dermatophytes. **Mycopathologia**, [s. l.], v. 182, n. 1–2, 2017. a.

DE HOOG, G. S.; DUKIK, K.; MONOD, M.; PACKEU, A.; STUBBE, D.; HENDRICKX, M.; KUPSCH, C.; STIELOW, J. B.; FREEKE, J.; GÖKER, M.; REZAEI-MATEHKOLAEI, A.; MIRHENDI, H.; GRÄSER, Y. Toward a novel multilocus phylogenetic taxonomy for the dermatophytes. **Mycopathologia**, [s. l.], v. 182, n. 1–2, 2017. b.

DE JALÓN, E. G.; BLANCO-PRÍETO, M. J.; YGARTUA, P.; SANTOYO, S. PLGA microparticles: possible vehicles for topical drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 226, n. 1–2, 2001.

DE LUCCA, A. J.; WALSH, T. J. Antifungal Peptides: Novel therapeutic compounds against emerging pathogens. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 43, n. 1, 1999.

DE MORAIS, C. B.; SCOPEL, M.; PEDRAZZA, G. P. R.; DA SILVA, F. K.; DALLA LANA, D. F.; TONELLO, M. L.; MIOTTO, S. T. S.; MACHADO, M. M.; DE OLIVEIRA, L. F. S.; FUENTEFRIA, A. M.; ZUANAZZI, J. A. S. Anti-dermatophyte activity of Leguminosae plants from Southern Brazil with emphasis on *Mimosa pigra* (Leguminosae). **Journal de Mycologie Médicale**, [s. l.], v. 27, n. 4, 2017.

DE OLIVEIRA SANTOS, G. C.; VASCONCELOS, C. C.; LOPES, A. J. O.; DE SOUSA CARTÁGENES, M. do S.; FILHO, A. K. D. B.; DO NASCIMENTO, F. R. F.; RAMOS, R. M.; PIRES, E. R. R. B.; DE ANDRADE, M. S.; ROCHA, F. M. G.; DE ANDRADE MONTEIRO, C. *Candida* infections and therapeutic strategies: mechanisms of action for traditional and alternative agents. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 9, 2018.

DE SOUZA, K. C. B.; BASSANI, V. L.; SCHAPOVAL, E. E. S. Influence of excipients and technological process on anti-inflammatory activity of quercetin and *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. extracts by oral route. **Phytomedicine**, [s. l.], v. 14, n. 2–3, 2007.

DEBLE, L. **O gênero Achyrocline (Less.) DC (Asteraceae: Gnaphalieae) no Brasil.** 2007. [s. l.], 2007.

DENNING, D. W.; HOPE, W. W. Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities. **Trends in Microbiology**, [s. l.], v. 18, n. 5, 2010.

DESHMUKH, A. S.; CHAUHAN, P. N.; NOOLVI, M. N.; CHATURVEDI, K.; GANGULY, K.; SHUKLA, S. S.; NADAGOUDA, M. N.; AMINABHAVI, T. M. Polymeric micelles: Basic research to clinical practice. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 532, n. 1, 2017.

DESMARCHELIER, C.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Antioxidant and free radical scavenging effects in extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (“marcela”). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [s. l.], v. 31, n. 9, 1998.

DIAN, L.; YU, E.; CHEN, X.; WEN, X.; ZHANG, Z.; QIN, L.; WANG, Q.; LI, G.; WU, C. Enhancing oral bioavailability of quercetin using novel soluplus polymeric micelles. **Nanoscale Research Letters**, [s. l.], v. 9, n. 1, 2014.

DICKEL, M. Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial. In: Região Sul. Brasília. p. 541–544.

DJORDJEVIC, S. M. From medicinal plant raw material to herbal remedies. In: **Aromatic and Medicinal Plants - Back to Nature**. [s.l.] Chapter 16, H. A. El-Shemy, Ed., pp. 269–288, InTech, 2018.

DUCEPPE, N.; TABRIZIAN, M. Advances in using chitosan-based nanoparticles for *in vitro* and *in vivo* drug and gene delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, [s. l.], v. 7, n. 10, 2010.

DUKIK, K.; DE HOOG, G. S.; STIELOW, J. B.; FREEKE, J.; VAN DEN ENDE, B. G.; VICENTE, V. A.; MENKEN, S. B. J.; AHMED, S. A. Molecular and phenotypic characterization of *Nannizzia* (Arthrodermataceae). **Mycopathologia**, [s. l.], 2019.

EFFERTH, T. The European directive on traditional herbal medicinal products: friend or foe for plant-based therapies? **Journal of Chinese Integrative Medicine**, [s. l.], v. 10, n. 4, 2012.

ELEWSKI, B.; RICH, P.; TOSTI, A.; PARISER, D.; SCHER, R. Onchomycosis: An overview. **J Drugs Dermatol**, [s. l.], v. 12, p. 96–103, 2013.

EMMONS, C. W. DERMATOPHYTES. **Archives of Dermatology and Syphilology**, [s. l.], v. 30, n. 3, 1934.

ESCALANTE, A.; GATTUSO, M.; PÉREZ, P.; ZACCHINO, S. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside b isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. **Journal of Natural Products**, [s. l.], v. 71, n. 10, 2008.

ESCOBAR, F. M.; SABINI, M. C.; ZANON, S. M.; TONN, C. E.; SABINI, L. I. Antiviral effect and mode of action of methanolic extract of *Verbascum thapsus* L. on Pseudorabies virus (strain RC/79). **Natural Product Research**, [s. l.], v. 26, n. 17, 2012.

ESCOBAR-CHAVEZ, J. J.; MERINO-SANJUÁN, V.; LÓPEZ-CERVANTES, M.; URBAN-MORLAN, Z.; PIÑÓN-SEGUNDO, E.; QUINTANAR-GUERRERO, D.; GANEM-QUINTANAR, A. The tape-stripping technique as a method for drug quantification in skin. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 11, n. 1, 2008.

FARAH, C. S.; ASHMAN, R. B.; CHALLACOMBE, S. J. Oral candidosis: **Clinics in Dermatology**, [s. l.], v. 18, n. 5, 2000.

FELIPE, D.; BRAMBILLA, L.; PORTO, C.; PILAU, E.; CORTEZ, D. Phytochemical analysis of *Pfaffia glomerata* inflorescences by LC-ESI-MS/MS. **Molecules**, [s. l.], v. 19, n. 10, 2014.

FENNER, R.; SORTINO, M.; KUZE RATES, S. M.; DALL'AGNOL, R.; FERRAZ, A.; BERNARDI, A. P.; ALBRING, D.; NÖR, C.; VON POSER, G.; SCHAPOVAL, E.; ZACCHINO, S. Antifungal activity of some Brazilian *Hypericum* species. **Phytomedicine**, [s. l.], v. 12, n. 3, 2005.

FERNÁNDEZ, B. **Sensibilidad antifúngica de los dermatofitos**. 2005. Reus, 2005.

FERNÁNDEZ-TORRES, B.; CABAÑES, F. J.; CARRILLO-MUÑOZ, A. J.; ESTEBAN, A.; INZA, I.; ABARCA, L.; GUARRO, J. Collaborative evaluation of optimal antifungal susceptibility testing conditions for dermatophytes. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 40, n. 11, 2002.

FERRARO, G.; ANESINI, C.; OUVIÑA, A.; RETTA, D.; FILIP, R.; GATUSSO, M. Total phenolic content and antioxidant activity of extracts of *Achyrocline satureioides* flowers from different zones in Argentina. **Latin American Journal of Pharmacy (formerly Acta Farmacéutica Bonaerense)**, [s. l.], v. 27, n. 4, 2008.

FITZGERALD, M.; HEINRICH, M.; BOOKER, A. Medicinal plant analysis: A historical and regional discussion of emergent complex techniques. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 10, 2020.

FROST, D. J.; BRANDT, K. D.; CUGIER, D.; GOLDMAN, R. A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. **The Journal of Antibiotics**, [s. l.], v. 48, n. 4, 1995.

GARG, A.; SHARMA, G. S.; GOYAL, A. K.; GHOSH, G.; SI, S. C.; RATH, G. Recent advances in topical carriers of anti-fungal agents. **Heliyon**, [s. l.], v. 6, n. 8, 2020.

GARG, A.; VENKATESH, V.; SINGH, M.; PATHAK, K. P.; KAUSHAL, G. P.; AGRAWAL, S. K. Onychomycosis in central India: a clinicoetiologic correlation. **International Journal of Dermatology**, [s. l.], v. 43, n. 7, 2004.

GODOY-MARTINEZ, P.; NUNES, F. G.; TOMIMORI-YAMASHITA, J.; URRUTIA, M.; ZAROR, L.; SILVA, V.; FISCHMAN, O. Onychomycosis in São Paulo, Brazil. **Mycopathologia**, [s. l.], v. 168, n. 3, 2009.

GOUVEIA, S.; CASTILHO, P. C. Characterisation of phenolic acid derivatives and flavonoids from different morphological parts of *Helichrysum obconicum* by a RP-HPLC–DAD–(–)–ESI–MSn method. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 129, n. 2, 2011.

GRÄSER, Y.; SAUNTE, D. A hundred years of diagnosing superficial fungal infections: where do we come from, where are we now and where would we like to go? **Acta Dermato Venereologica**, [s. l.], v. 100, n. 9, 2020.

GRASSI-ZAMPIERON, R.; FRANÇA, L. V.; CAROLLO, C. A.; VIEIRA, M. do C.; OLIVEROS-BASTIDAS, A.; SIQUEIRA, J. M. De. Comparative profiles of *Achyrocline alata* (Kunth) DC. and *A. satureioides* (Lam.) DC., Asteraceae, applying HPLC-DAD-MS. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 20, n. 4, 2010. a.

GRASSI-ZAMPIERON, R.; FRANÇA, L. V.; CAROLLO, C. A.; VIEIRA, M. do C.; OLIVEROS-BASTIDAS, A.; SIQUEIRA, J. M. De. Comparative profiles of *Achyrocline alata* (Kunth) DC. and *A. satureioides* (Lam.) DC., Asteraceae, applying HPLC-DAD-MS. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 20, n. 4, 2010. b.

GRIFFIN, D. A perfect stage of *Microsporum gypseum*. **Nature (London)**, [s. l.], v. 186, p. 94–95, 1960.

GRUNWALD, M. H.; AMICHAÏ, B.; SHEMER, A. Fingertip contamination after a brief touch of tinea capitis lesions caused by *Microsporum canis*. **British Journal of Dermatology**, [s. l.], v. 172, n. 1, 2015.

GUJAR, T. P.; SHINDE, V. R.; LOKHANDE, C. D.; KIM, W.-Y.; JUNG, K.-D.; JOO, O.-S. Spray deposited amorphous RuO<sub>2</sub> for an effective use in electrochemical supercapacitor. **Electrochemistry Communications**, [s. l.], v. 9, n. 3, 2007.

GUPTA, M.; BLUHM, B.; BA, M. Ciclopirox (Loprox) gel for superficial fungal infections. **Skin Therapy Lett**, [s. l.], v. 7, p. 4–5, 2004.

HAINER, B. Dermatophyte infections. **Am. Fam. Physician**, [s. l.], v. 67, p. 101–108, 2003.

HALLIWELL, B. **Encyclopedia of Life Sciences**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2001.

HAMMER, K. *In-vitro* activity of essential oils, in particular *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and tea tree oil products, against *Candida* spp. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 42, n. 5, 1998.

HAMMER, K. A. *In vitro* activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against dermatophytes and other filamentous fungi. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 50, n. 2, 2002.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. *In vitro* activities of ketoconazole, econazole, miconazole, and *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil against *Malassezia* species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 44, n. 2, 2000.

HANCOCK, R. E. W.; CHAPPLE, D. S. Peptide antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 43, n. 6, 1999.

HATAHET, T.; MORILLE, M.; HOMMOSS, A.; DEVOISSELLE, J. M.; MÜLLER, R. H.; BÉGU, S. Quercetin topical application, from conventional dosage forms to nanodosage forms. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 108, 2016.

HAVLICKOVA, B.; CZAİKA, V. A.; FRIEDRICH, M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. **Mycoses**, [s. l.], v. 51, 2008.

HAY, R. **Antibiotic and Antifungal Therapies in Dermatology**. [s.l: s.n.].

HAYETTE, M.-P.; SACHELI, R. Dermatophytosis, trends in epidemiology and diagnostic approach. **Current Fungal Infection Reports**, [s. l.], v. 9, n. 3, 2015.

HENRIQUES, B. S.; GARCIA, E. S.; AZAMBUJA, P.; GENTA, F. A. Determination of chitin content in insects: An alternate method based on calcofluor staining. **Frontiers in Physiology**, [s. l.], v. 11, 2020.

HERTH, W.; SCHNEPF, E. The fluorochrome, calcofluor white, binds oriented to structural polysaccharide fibrils. **Protoplasma**, [s. l.], v. 105, n. 1–2, 1980.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 97, n. 7, 2002.

HOLZSCHUH, M. H.; GOSMANN, G.; SCHNEIDER, P. H.; SCHAPOVAL, E. E. S.; BASSANI, V. L. Identification and stability of a new bichalcone in *Achyrocline satureioides* spray dried powder. **Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 65, 2010.

HVATTUM, E.; EKEBERG, D. Study of the collision-induced radical cleavage of flavonoid glycosides using negative electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, [s. l.], v. 38, n. 1, 2003.

I. ACHIKA, J.; ARTHUR, D. E.; GERALD, I.; ADEDAYO, A. A review on the phytoconstituents and related medicinal properties of plants in the Asteraceae Family. **IOSR Journal of Applied Chemistry**, [s. l.], v. 7, n. 8, 2014.

ICH. Guideline for Good Clinical Practice E6 (R2). In: **Boas Práticas Clínicas: ICH harmonised tripartite guidelines**. [s.l: s.n.]. v. 4.

JACOBI, U.; WEIGMANN, H.-J.; ULRICH, J.; STERRY, W.; LADEMANN, J. Estimation of the relative stratum corneum amount removed by tape stripping. **Skin Research and Technology**, [s. l.], v. 11, n. 2, 2005.

JIN, X.; ZHOU, B.; XUE, L.; SAN, W. Soluplus® micelles as a potential drug delivery system for reversal of resistant tumor. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 69, 2015.

JOHN, A. M.; SCHWARTZ, R. A.; JANNIGER, C. K. The kerion: an angry Tinea capitis. **International Journal of Dermatology**, [s. l.], v. 57, n. 1, 2018.

JOPPA, L. N.; ROBERTS, D. L.; MYERS, N.; PIMM, S. L. Biodiversity hotspots house most undiscovered plant species. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 108, n. 32, 2011.

JYOTHI, N. V. N.; PRASANNA, P. M.; SAKARKAR, S. N.; PRABHA, K. S.; RAMAIAH, P. S.; SRAWAN, G. Y. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. **Journal of Microencapsulation**, [s. l.], v. 27, n. 3, 2010.

KANBE, T. Molecular Approaches in the Diagnosis of Dermatophytosis. **Mycopathologia**, [s. l.], v. 166, n. 5–6, 2008.

KARAKAYA, S.; YILMAZ, N. Lycopene content and antioxidant activity of fresh and processed tomatoes and in vitro bioavailability of lycopene. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [s. l.], v. 87, n. 12, 2007.

KATAOKA, K.; HARADA, A.; NAGASAKI, Y. Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 47, n. 1, 2001.

KESHARWANI, S. S.; KAUR, S.; TUMMALA, H.; SANGAMWAR, A. T. Multifunctional approaches utilizing polymeric micelles to circumvent multidrug resistant tumors. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 173, 2019.

KHOSRAVI, A. R.; SHOKRI, H.; VAHEDI, G. Factors in etiology and predisposition of adult tinea capitis and review of published literature. **Mycopathologia**, [s. l.], v. 181, n. 5–6, 2016.

KIZNY GORDON, A.; MCIVER, C.; KIM, M.; MURRELL, D. F.; TAYLOR, P. Clinical application of a molecular assay for the detection of dermatophytosis and a novel non-invasive sampling technique. **Pathology**, [s. l.], v. 48, n. 7, 2016.

KOOLEN, H. H. F.; DA SILVA, F. M. A.; GOZZO, F. C.; DE SOUZA, A. Q. L.; DE SOUZA, A. D. L. Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) by UPLC–ESI-MS/MS. **Food Research International**, [s. l.], v. 51, n. 2, 2013.

KREIJKAMP-KASPERS, S.; HAWKE, K.; GUO, L.; KERIN, G.; BELL-SYER, S. E.; MAGIN, P.; BELL-SYER, S. V.; VAN DRIEL, M. L. Oral antifungal medication for

toenail onychomycosis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, [s. l.], v. 2017, n. 7, 2017.

KUMAR, A.; GWALA, B.; MEENA, H.; BHAKUNI, H.; BHARATKUMAR, C. Review of *Dadru kushtha* w.s.r. to fungal dermatophytosis: a conceptual study. **World Journal of Pharmaceutical Research**, [s. l.], v. 10, p. 219–233, 2021.

KURUP, A. S.; PARAMBATH, F. C.; KHADER, A.; RAJI, T.; JOSE, B. P. Identification and *in vitro* antifungal susceptibility of dermatophyte species isolated from lesions of cutaneous dermatophytosis: A cross-sectional study. **Journal of Skin and Sexually Transmitted Diseases**, [s. l.], v. 0, 2021.

KWON-CHUNG, K. Dermatophytoses. **Medical Mycology**, [s. l.], p. 105–161, 1992.

LECHA, M. Amorolfine and itraconazole combination for severe toenail onychomycosis; results of an open randomized trial in Spain. **British Journal of Dermatology**, [s. l.], v. 145, n. S60, 2008.

LEDEZMA, E.; MARCANO, K.; JORQUERA, A.; DE SOUSA, L.; PADILLA, M.; PULGAR, M.; APITZ-CASTRO, R. Efficacy of ajoene in the treatment of tinea pedis: A double-blind and comparative study with terbinafine. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [s. l.], v. 43, n. 5, 2000.

LEE, W.; LEE, D. G. An antifungal mechanism of curcumin lies in membrane-targeted action within *Candida albicans*. **IUBMB Life**, [s. l.], v. 66, n. 11, 2014.

LOMBARDI BORGIA, S.; REGEHLY, M.; SIVARAMAKRISHNAN, R.; MEHNERT, W.; KORTING, H. C.; DANKER, K.; RÖDER, B.; KRAMER, K. D.; SCHÄFER-KORTING, M. Lipid nanoparticles for skin penetration enhancement—correlation to drug localization within the particle matrix as determined by fluorescence and plectric spectroscopy. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 110, n. 1, 2005.

LORENZI, H. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. In: Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora (Ed.). [s.l: s.n.]. p. 512.

MABONA, U.; VILJOEN, A.; SHIKANGA, E.; MARSTON, A.; VAN VUUREN, S. Antimicrobial activity of southern African medicinal plants with dermatological relevance: From an ethnopharmacological screening approach, to combination studies and the isolation of a bioactive compound. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 148, n. 1, 2013.

MAGAGNIN, C. M.; STOPIGLIA, C. D. O.; VIEIRA, F. J.; HEIDRICH, D.; MACHADO, M.; VETORATTO, G.; LAMB, F. M.; SCROFERNEKER, M. L. Perfil de suscetibilidade a antifúngicos de dermatófitos isolados de pacientes com insuficiência renal crônica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [s. l.], v. 86, n. 4, 2011.

MALLIKARJUNA, N. N.; MANOHAR, S. K.; KULKARNI, P. V.; VENKATARAMAN, A.; AMINABHAVI, T. M. Novel high dielectric constant nanocomposites of polyaniline dispersed with  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles. **Journal of Applied Polymer Science**, [s. l.], v. 97, n. 5, 2005.

MARKANTONATOU, A.-M.; SAMARAS, K.; ZACHROU, E.; VYZANTIADIS, T.-A. Comparison of four methods for the in vitro susceptibility testing of dermatophytes. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 11, 2020.

MARTINEZ-ROSSI, N. M.; BITENCOURT, T. A.; PERES, N. T. A.; LANG, E. A. S.; GOMES, E. V.; QUARESEMIN, N. R.; MARTINS, M. P.; LOPES, L.; ROSSI, A. Dermatophyte resistance to antifungal drugs: Mechanisms and prospectus. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 9, 2018. a.

MARTINEZ-ROSSI, N. M.; BITENCOURT, T. A.; PERES, N. T. A.; LANG, E. A. S.; GOMES, E. V.; QUARESEMIN, N. R.; MARTINS, M. P.; LOPES, L.; ROSSI, A. dermatophyte resistance to antifungal drugs: Mechanisms and prospectus. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 9, 2018. b.

MILLIKAN, L. Role of oral antifungal agents for the treatment of superficial fungal infections in immunocompromised patients. [s. l.], p. 6–14, 2001.

MORESCO, K. S.; SILVEIRA, A. K.; ZEIDÁN-CHULIÁ, F.; CORREA, A. P. F.; OLIVERIA, R. R.; BORGES, A. G.; GRUN, L.; BARBÉ-TUANA, F.; ZMOZINSKI,

A.; BRANDELLI, A.; VALE, M. G. R.; GELAIN, D. P.; BASSANI, V. L.; MOREIRA, J. C. F. Effects of *Achyrocline satureioides* inflorescence extracts against pathogenic intestinal bacteria: chemical characterization, *in vitro* tests, and *in vivo* evaluation. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], v. 2017, 2017.

MORRIS, M. I.; VILLMANN, M. Echinocandins in the management of invasive fungal infections, part 1. **American Journal of Health-System Pharmacy**, [s. l.], v. 63, n. 18, 2006.

MOTA, F. M.; CARVALHO, H. H. C.; WIEST, J. M. Atividade antibacteriana *in vitro* de inflorescências de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. - Asteraceae (“macela”, “marcela”) sobre agentes bacterianos de interesse em alimentos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [s. l.], v. 13, n. 3, 2011.

MÜLLER, G. G.; KARA-JOSÉ, N.; CASTRO, R. S. De. Antifúngicos em infecções oculares: drogas e vias de administração. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, [s. l.], v. 72, n. 2, 2013.

NAGANAWA, R. Inhibition of *Paracoccidioides brasiliensis* by ajoene is associated with blockade of phosphatidylcholine biosynthesis. **Microbiology**, [s. l.], v. 144, n. 1, 1998.

NAKAJIMA, J. N.; SEMIR, J. Asteraceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, [s. l.], v. 24, n. 4, 2001.

NANNIZZI, A. icerche sull'origine saprofitica del funghi delle tigne *Gymnoascus gypseum* sp n forma ascofora del *Sabouraudites (Achorion) gypseum (Bodin)* Ota et Langeron. **Atti. Accad. Fisiocr.**, [s. l.], v. 10, p. 89–97, 1961.

NCUBE, E. N.; MHLONGO, M. I.; PIATER, L. A.; STEENKAMP, P. A.; DUBERY, I. A.; MADALA, N. E. Analyses of chlorogenic acids and related cinnamic acid derivatives from *Nicotiana tabacum* tissues with the aid of UPLC-QTOF-MS/MS based on the in-source collision-induced dissociation method. **Chemistry Central Journal**, [s. l.], v. 8, n. 1, 2014.

NEGRI, M.; SALCI, T.; SHINOBU-MESQUITA, C.; CAPOCI, I.; SVIDZINSKI, T.; KIOSHIMA, E. Early state research on antifungal natural products. **Molecules**, [s. l.], v. 19, n. 3, 2014.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, [s. l.], v. 83, n. 3, 2020.

NUÑEZ, C. **Las plantas Medicinales del Sur de la Provincia de Córdoba**. Rio Cuatro.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, [s. l.], v. 267, n. 17, 2000.

ODA, F. B.; CREVELIN, E. J.; CROTTI, A. E. M.; ORLANDO, A. B.; DE MEDEIROS, A. I.; NOGUEIRA, F. A. R.; DOS SANTOS, A. G. Acidic and hepatic derivatives of bioactive clerodane diterpenes casearins J and O. **Fitoterapia**, [s. l.], v. 137, 2019.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais *in vitro* pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [s. l.], v. 17, n. 1, 2015.

PANT, P.; PANDEY, S.; DALL'ACQUA, S. The influence of environmental conditions on secondary metabolites in medicinal plants: A literature review. **Chemistry & Biodiversity**, [s. l.], v. 18, n. 11, 2021.

PAPO, N.; SHAI, Y. Host defense peptides as new weapons in cancer treatment. **CMLS Cellular and Molecular Life Sciences**, [s. l.], v. 62, n. 7–8, 2005.

PATEL, R.; PATEL, J. Novel technologies of oral controlled release drug delivery system. **Systematic Reviews in Pharmacy**, [s. l.], v. 1, n. 2, 2010.

PATRA, J. K.; DAS, G.; FRACETO, L. F.; CAMPOS, E. V. R.; RODRIGUEZ-TORRES, M. del P.; ACOSTA-TORRES, L. S.; DIAZ-TORRES, L. A.; GRILLO, R.; SWAMY, M. K.; SHARMA, S.; HABTEMARIAM, S.; SHIN, H.-S. Nano based drug

delivery systems: recent developments and future prospects. **Journal of Nanobiotechnology**, [s. l.], v. 16, n. 1, 2018.

PEERAPUR, B. V.; INAMDAR, A. C.; PUSHPA, P. V.; SRIKANT, B. Clinicomycological study of dermatophytosis in Bijapur. **Indian Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 22, n. 4, [s.d.].

PEŠIĆ, M. The significance of sustainable development of natural product drugs . **Brief for United Nations Global Sustainable Development Report**, [s. l.], 2015.

PILLAI, C. K. S.; PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. **Progress in Polymer Science**, [s. l.], v. 34, n. 7, 2009.

PIMM, S. L.; JENKINS, C. N.; ABELL, R.; BROOKS, T. M.; GITTLEMAN, J. L.; JOPPA, L. N.; RAVEN, P. H.; ROBERTS, C. M.; SEXTON, J. O. The biodiversity of species and their rates of extinction, distribution, and protection. **Science**, [s. l.], v. 344, n. 6187, 2014.

PINKUS, H. Examination of the epidermis by the strip method of removing horny layers. **Journal of Investigative Dermatology**, [s. l.], v. 16, n. 6, 1951.

POTHAKAMURY, U. R.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Fundamental aspects of controlled release in foods. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 6, n. 12, 1995.

REDDY, N.; YANG, Y. Potential of plant proteins for medical applications. **Trends in Biotechnology**, [s. l.], v. 29, n. 10, 2011.

RETTA, D.; DELLACASSA, E.; VILLAMIL, J.; SUÁREZ, S. A.; BANDONI, A. L. Marcela, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: A review. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 38, 2012.

REYNAUD, F.; TSAPIS, N.; DEYME, M.; VASCONCELOS, T. G.; GUEUTIN, C.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; FATTAL, E. Spray-dried chitosan-metal microparticles for ciprofloxacin adsorption: Kinetic and equilibrium studies. **Soft Matter**, [s. l.], v. 7, n. 16, 2011.

REZAEI-MATEHKOLAEI, A.; MAKIMURA, K.; DE HOOG, S.; SHIDFAR, M. R.; ZAINI, F.; ESHRAGHIAN, M.; NAGHAN, P. A.; MIRHENDI, H. Molecular epidemiology of dermatophytosis in Tehran, Iran, a clinical and microbial survey. **Medical Mycology**, [s. l.], v. 51, n. 2, 2013.

RODRIGUES, K.; RAMOS, D. F.; CARRION, L. L.; CURSINO, L. M. C.; JEFREYS, M. F.; PEDROZA, L. S.; OSÓRIO, M. I. C.; OLIVEIRA, J. L.; ANDRADE, J. I. A.; FERNANDES, C. C.; NUNEZ, C. V.; SILVA, P. E. A. Antifungal activity of brazilian amazon plants extracts against some species of *Candida* spp. **International Journal of Phytopharmacology**, [s. l.], v. 5, n. 6, p. 445–453, 2014.

ROLNIK, A.; OLAS, B. The plants of the Asteraceae family as agents in the protection of human health. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 6, 2021.

RONCERO, C.; DURÁN, A. Effect of Calcofluor white and Congo red on fungal cell wall morphogenesis: in vivo activation of chitin polymerization. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 163, n. 3, 1985.

ROQUE, N.; TELES, A. M.; MOURA, L.; PACHECO, R. A.; DA SILVA, G. H. L.; ALVES, M.; NAKAJIMA, J. N. Check-list de Asteraceae no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Iheringia, Série Botânica**, [s. l.], v. 73, n. Suppl, 2018.

ROUTT, E. T.; JIM, S. C.; ZEICHNER, J. A.; KIRCIK, L. H. What is new in fungal pharmacotherapeutics? **Journal of drugs in dermatology : JDD**, [s. l.], v. 13, n. 4, 2014.

RUFINO, M.; ALVES, R.; BRITO, E.; MORAIS, S.; SAMPAIO, C.; JIMENEZ, J. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Comunicado técnico. Embrapa, Ministerio da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, [s. l.], 2007. a.

RUFINO, M.; ALVES, R.; SOUSA DE BRITO, E.; MAIA DE MORAIS, S.; SAMPAIO, C.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH.

**Comunicado técnico. Embrapa, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, [s. l.], v. Fortaleza, 2007. b.

SABINI, M. C.; ESCOBAR, F. M.; TONN, C. E.; ZANON, S. M.; CONTIGIANI, M. S.; SABINI, L. I. Evaluation of antiviral activity of aqueous extracts from *Achyrocline satureioides* against Western equine encephalitis virus. **Natural Product Research**, [s. l.], v. 26, n. 5, 2012.

SAHM, D.; FORBES, B.; WEISSFELD, A. **Diagnostico Microbiológico**. 12va. ed. [s.l: s.n.].

SAHOO, A.; MAHAJAN, R. Management of tinea corporis, tinea cruris, and tinea pedis: A comprehensive review. **Indian Dermatol Online J.**, [s. l.], v. 2, n. 7, p. 77–86, 2016. a.

SAHOO, A.; MAHAJAN, R. Management of tinea corporis, tinea cruris, and tinea pedis: A comprehensive review. **Indian Dermatology Online Journal**, [s. l.], v. 7, n. 2, 2016. b.

SAIJA, A. “In vitro” antioxidant and photoprotective properties and interaction with model membranes of three new quercetin esters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 56, n. 2, 2003.

SALMERÓN-MANZANO, E.; GARRIDO-CARDENAS, J. A.; MANZANO-AGUGLIARO, F. Worldwide research trends on medicinal plants. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [s. l.], v. 17, n. 10, 2020.

SAN-BIAS, G.; URBINA, J. A.; MARCHÁN, E.; CONTRERAS, L. M.; SORAIS, F.; SAN-BLAS, F. *Paracoccidioides brasiliensis* by ajoene is associated with blockade of phosphatidylcholine biosynthesis. **Microbiology**, [s. l.], v. 143, n. 5, 1997.

SANTOS, D. A.; HAMDAN, J. S. In vitro activities of four antifungal drugs against *Trichophyton rubrum* isolates exhibiting resistance to fluconazole. **Mycoses**, [s. l.], v. 50, n. 4, 2007.

SANTOS, M. R. A.; LIMA, R. A.; SILVA, A. G.; LIMA, D. K. S.; SALLET, L. A. P.; TEIXEIRA, C. A. D.; FACUNDO, V. A. Composição química e atividade inseticida

do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) sobre a broca-do-café (*Hypothenemus hampei*) Ferrari. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [s. l.], v. 15, n. 4 suppl 1, p. 757–762, 2013.

SAVI, D. C.; ALUIZIO, R.; GLIENKE, C. Brazilian plants: An unexplored source of endophytes as producers of active metabolites. **Planta Medica**, [s. l.], v. 85, n. 08, 2019.

SEEBACHER, C. Moderne antimykotika. **Der Hautarzt**, [s. l.], v. 55, n. 2, 2004.

SEEBACHER, C.; BOUCHARA, J.-P.; MIGNON, B. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. **Mycopathologia**, [s. l.], v. 166, n. 5–6, 2008.

SEGALE, L.; GIOVANNELLI, L.; MANNINA, P.; PATTARINO, F. Formulation and characterization study of itraconazole-loaded microparticles. **Pharmaceutical Development and Technology**, [s. l.], v. 20, n. 2, 2015.

SELITRENNIKOFF, C. P. Antifungal proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 67, n. 7, 2001.

SHERSHNEVA, A. M.; MURUEVA, A. V.; ZHILA, N. O.; VOLOVA, T. G. Antifungal activity of P3HB microparticles containing tebuconazole. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, [s. l.], v. 54, n. 3, 2019.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; BAUER, L.; LANGELOH, A. Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., compositae. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 22, n. 3, 1988.

SIMÕES, C.; SCHENKEL, E.; GOSMANN, G.; MELLO, J.; MENTZ, L.; PETROVICK, P. Farmacognosia: da planta ao medicamento. In: EDITORA UFSC (Ed.). 5ª ed ed. Porto Alegre/Florianópolis.

SINGAL, A.; PANDHI, D.; DAS, S.; YADAV, P. Clinico-mycological study of dermatophyte toenail onychomycosis in New Delhi, India. **Indian Journal of Dermatology**, [s. l.], v. 60, n. 2, 2015.

SINGAL, A.; RAWAT, S.; BHATTACHARYA, S. N.; MOHANTY, S.; BARUAH, M. C. Clinico-mycological profile of *Tinea capitis* in north India and response to griseofulvin. **The Journal of Dermatology**, [s. l.], v. 28, n. 1, 2001.

SINGH, M.; HEMANT, K.; SHIVAKUMAR, H. Microencapsulation: a promising technique for controlled drug delivery. **Research in Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 5, n. 2, 2010.

SINGH, S.; PATWA, D.; TILAK, R.; DAS, A.; SINGH, T. *In vitro* susceptibility of dermatophytes to oral antifungal drugs and amphotericin B in Uttar Pradesh, India. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, [s. l.], v. 85, n. 4, 2019.

SOARES, L. A.; GULLO, F. P.; SARDI, J. de C. O.; PITANGUI, N. de S.; COSTA-ORLANDI, C. B.; SANGALLI-LEITE, F.; SCORZONI, L.; REGASINI, L. O.; PETRÔNIO, M. S.; SOUZA, P. F.; SILVA, D. H. S.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. Anti- *Trichophyton* activity of protocatechuates and their synergism with fluconazole. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], v. 2014, 2014.

SOARES, L. A.; SARDI, J. de C. O.; GULLO, F. P.; PITANGUI, N. de S.; SCORZONI, L.; LEITE, F. S.; GIANNINI, M. J. S. M.; ALMEIDA, A. M. F. Anti dermatophytic therapy: prospects for the discovery of new drugs from natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 44, n. 4, 2013.

SOUZA, P. O. De; BIANCHI, S. E.; FIGUEIRÓ, F.; HEIMFARTH, L.; MORESCO, K. S.; GONÇALVES, R. M.; HOPPE, J. B.; KLEIN, C. P.; SALBEGO, C. G.; GELAIN, D. P.; BASSANI, V. L.; ZANOTTO FILHO, A.; MOREIRA, J. C. F. Anticancer activity of flavonoids isolated from *Achyrocline satureioides* in gliomas cell lines. **Toxicology in Vitro**, [s. l.], v. 51, 2018.

SOUZA, L. K. H. e; OLIVEIRA, C. M. A. De; FERRI, P. H.; SANTOS, S. C.; OLIVEIRA JÚNIOR, J. G. De; MIRANDA, A. T. B.; LIÃO, L. M.; SILVA, M. do R. R. Antifungal properties of Brazilian cerrado plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 33, n. 3, 2002. a.

SOUZA, L. K. H. e; OLIVEIRA, C. M. A. De; FERRI, P. H.; SANTOS, S. C.; OLIVEIRA JÚNIOR, J. G. De; MIRANDA, A. T. B.; LIÃO, L. M.; SILVA, M. do R. R. Antifungal properties of Brazilian cerrado plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 33, n. 3, 2002. b.

SPAGNOL, C. M.; ZAERA, A. M.; ISAAC, V. L. B.; CORRÊA, M. A.; SALGADO, H. R. N. Release and permeation profiles of spray-dried chitosan microparticles containing caffeic acid. **Saudi Pharmaceutical Journal**, [s. l.], v. 26, n. 3, 2018.

STEVENS, D. A. Zeamatin, clotrimazole and nikkomycin Z in therapy of a *Candida* vaginitis model. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 50, n. 3, 2002.

STOCKDALE, P. M. The *Microsporium gypseum* complex (*Nannizzia incurvata* Stockd., *N. gypsea* (Nann.) comb. nov., *N. fulva* sp. nov.). **Sabouraudia**, [s. l.], v. 3, n. 1, 1963.

SYKES, J. E.; OUTERBRIDGE, C. A. Dermatophytosis. In: **Canine and Feline Infectious Diseases**. [s.l.] : Elsevier, 2014.

TEODORO, G. R.; ELLEPOLA, K.; SENEVIRATNE, C. J.; KOGA-ITO, C. Y. Potential use of phenolic acids as Anti-*Candida* agents: A Review. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 6, 2015.

TORCHILIN, V. P. Micellar nanocarriers: Pharmaceutical perspectives. **Pharmaceutical Research**, [s. l.], v. 24, n. 1, 2006.

VALDÉS, B. Estructura y actividad de los antifúngicos. **Rev Cubana Farm**, [s. l.], v. 39, n. 2, 2005.

VAZQUEZ, J.; ARGANOZA, M.; BOIKOV, D.; VAISHAMPAYAN, J.; AKINS, R. *In vitro* susceptibilities of *Candida* and *Aspergillus* species to *Melaleuca alternifolia* (Tea tree) oil. **Rev Iberoam Micol**, [s. l.], v. 17, p. 60–63, 2000.

VENDRUSCOLO, G. S.; RATES, S. M. K.; MENTZ, L. A. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 15, n. 4, 2005.

VENTURA, C. A.; TOMMASINI, S.; CRUPI, E.; GIANNONE, I.; CARDILE, V.; MUSUMECI, T.; PUGLISI, G. Chitosan microspheres for intrapulmonary administration of moxifloxacin: Interaction with biomembrane models and in vitro permeation studies. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 68, n. 2, 2008.

VERPOORTE, R.; MEMELINK, J. Engineering secondary metabolite production in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, [s. l.], v. 13, n. 2, 2002.

VISHWAKARMA, A. P.; VISHWE, A.; SAHU, P.; CHAURASIYA, A. Magical Remedies of *Terminalia arjuna* (ROXB.), **International Journal of Pharmaceutical Archive**, 2, 189-201, 2013.

VOGT, V.; TONN, C.; SABINI, L.; ROSAS, S. Fungitoxic effects of *Achyrocline satureioides* (marcela) on plant pathogens. **Molecular Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 21, p. 109–112, 2010.

VOLPE, A. Farmacobotânica das partes aéreas de *Achyrocline alata* D. C. (Asteraceae). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, [s. l.], v. 25, p. 505–511, 2006.

WADHWA, S.; PALIWAL, R.; RAI PALIWAL, S.; P. VYAS, S. Chitosan and its role in ocular therapeutics. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 9, n. 14, 2009.

WALTON, D. E.; MUMFORD, C. J. Spray dried products—Characterization of particle morphology. **Chemical Engineering Research and Design**, [s. l.], v. 77, n. 1, 1999.

WAN, C.-X.; LUO, J.-G.; GU, Y.-C.; XU, D.-R.; KONG, L.-Y. Characterisation of homoflavonoids from Three *Ophioglossum* species using liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionisation tandem mass spectrometry. **Phytochemical Analysis**, [s. l.], v. 24, n. 6, 2013.

WANG, S.; ZHANG, D.; ZHU, J.; LIU, H.; LI, B.; HUANG, L. Achyrophenols A–F: polycyclic polyphenol lactone skeletons and a nor-ursane-type triterpenoid from

*Achyrocline satureioides*. **The Journal of Organic Chemistry**, [s. l.], v. 86, n. 18, 2021.

WHO. Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines. **WHO Regional Office for the Western Pacific**, [s. l.], 1993.

WHO. Bulbus Allii Kativi. In: GRAPHICS GENEVA (Ed.). **WHO monographs on selected medicinal plants**. [s.l: s.n.]. p. 16–32.

WHO. Aetheroleum *Melaleucaae alternifoliae*. In: GRAPHICS GENEVA (Ed.). **WHO monographs on selected medicinal plants**. [s.l: s.n.]. p. 172–179.

WHO. The World medicines situation 2011 - Traditional Medicines: Global situation, issues and challenges. **World Health Organization**, [s. l.], 2011.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. <http://www.who.int/zoonoses/en/>, [s. l.], 2018.

WONG, S. S. W.; KAO, R. Y. T.; YUEN, K. Y.; WANG, Y.; YANG, D.; SAMARANAYAKE, L. P.; SENEVIRATNE, C. J. *In vitro* and *In vivo* activity of a novel antifungal small molecule against *Candida* infections. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 1, 2014.

WOODFOLK, J. A. Allergy and Dermatophytes. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 18, n. 1, 2005.

XIAO, J.; ZHANG, Y.; WANG, J.; YU, W.; WANG, W.; MA, X. Monitoring of cell viability and proliferation in hydrogel-encapsulated system by resazurin assay. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 162, n. 7, 2010.

YEUNG, B. K. Natural product drug discovery: the successful optimization of ISP-1 and halichondrin B. **Current Opinion in Chemical Biology**, [s. l.], v. 15, n. 4, 2011.

YUN, J.; LEE, H.; KO, H. J.; WOO, E.-R.; LEE, D. G. Fungicidal effect of isoquercitrin via inducing membrane disturbance. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, [s. l.], v. 1848, n. 2, 2015.

ZAPPI, D. C. et al. Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, [s. l.], v. 66, n. 4, 2015.

ZHANG, J.; LI, Y.; FANG, X.; ZHOU, D.; WANG, Y.; CHEN, M. TPGS-g-PLGA/Pluronic F68 mixed micelles for tanshinone IIA delivery in cancer therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 476, n. 1–2, 2014.

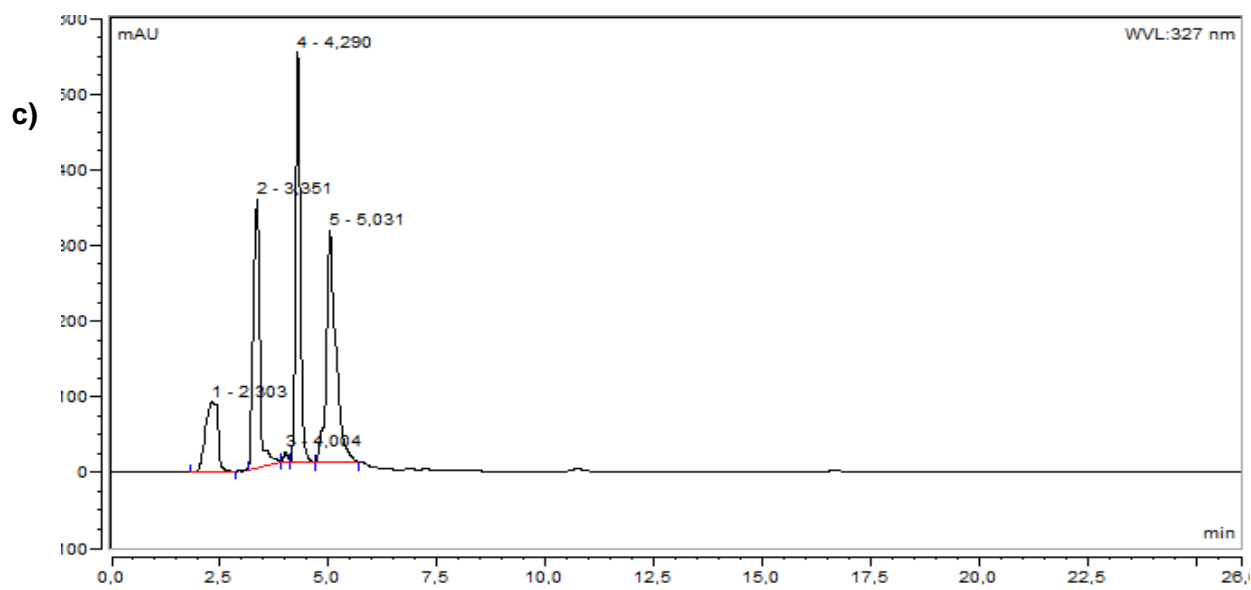
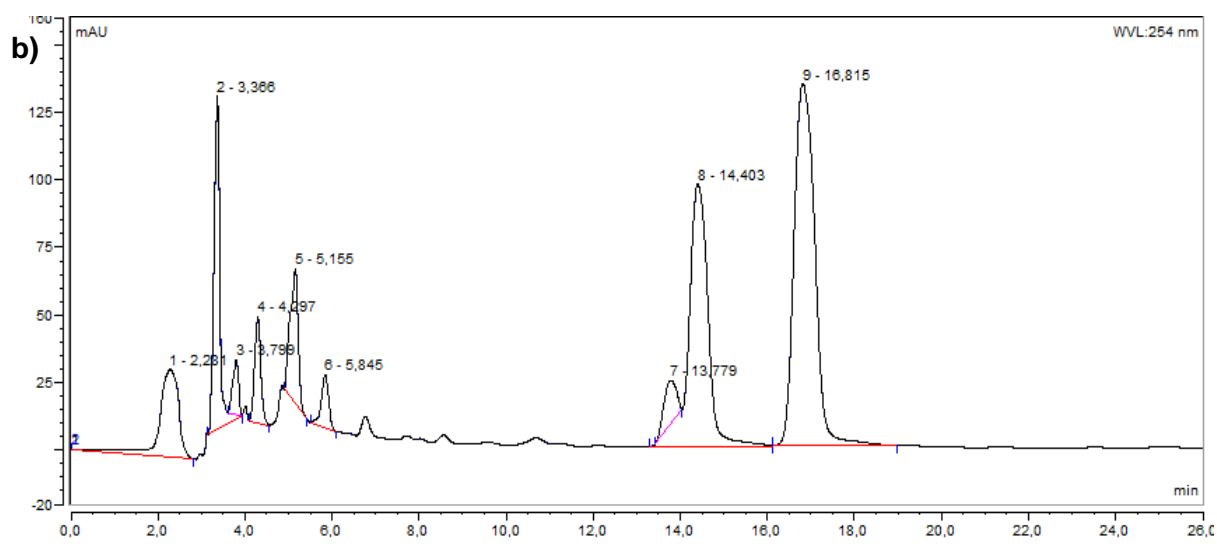
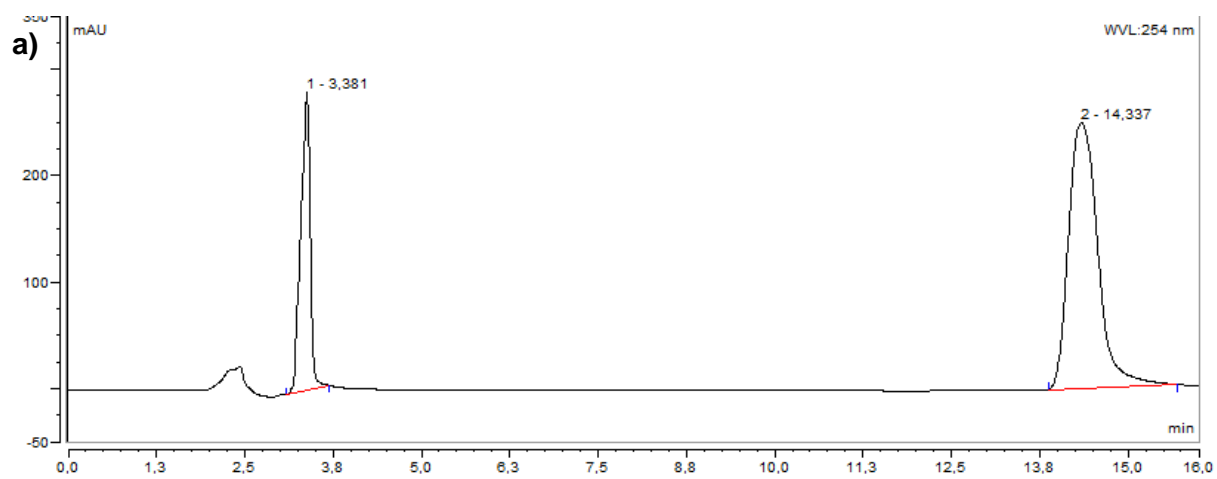
ZHENG, Y.; HAWORTH, I. S.; ZUO, Z.; CHOW, M. S. S.; CHOW, A. H. L. Physicochemical and structural characterization of quercetin- $\beta$ -cyclodextrin complexes. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 94, n. 5, 2005.

ZHONG, Y.; JING, G.; TIAN, B.; HUANG, H.; ZHANG, Y.; GOU, J.; TANG, X.; HE, H.; WANG, Y. Supersaturation induced by Itraconazole/Soluplus® micelles provided high GI absorption in vivo. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 11, n. 2, 2016.

ZHU, X.; ZENG, X.; ZHANG, X.; CAO, W.; WANG, Y.; CHEN, H.; WANG, T.; TSAI, H.-I.; ZHANG, R.; CHANG, D.; HE, S.; MEI, L.; SHI, X. The effects of quercetin-loaded PLGA-TPGS nanoparticles on ultraviolet B-induced skin damages in vivo. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, [s. l.], v. 12, n. 3, 2016.

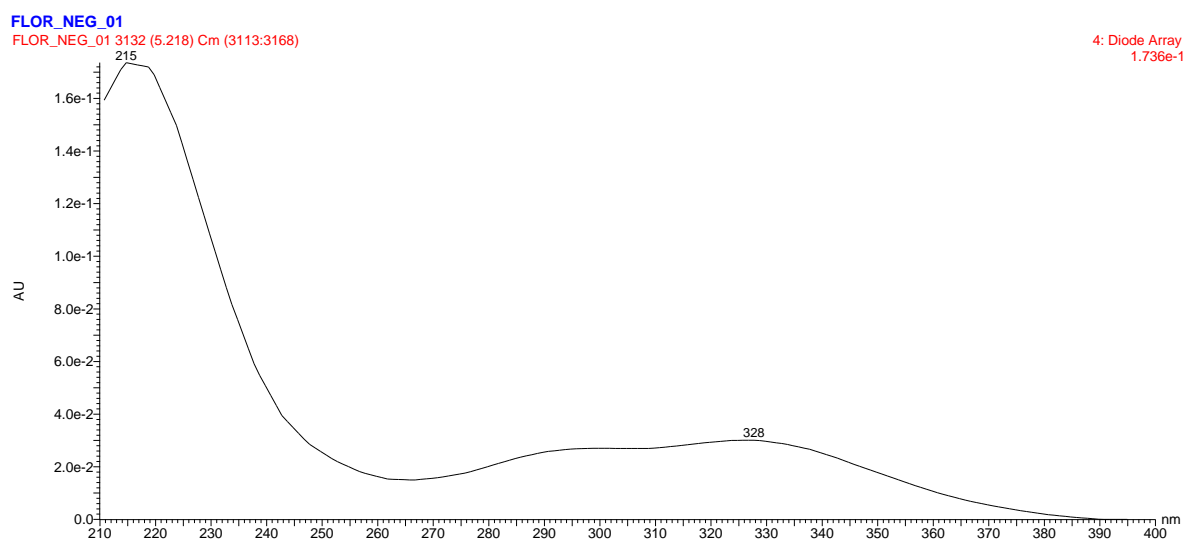
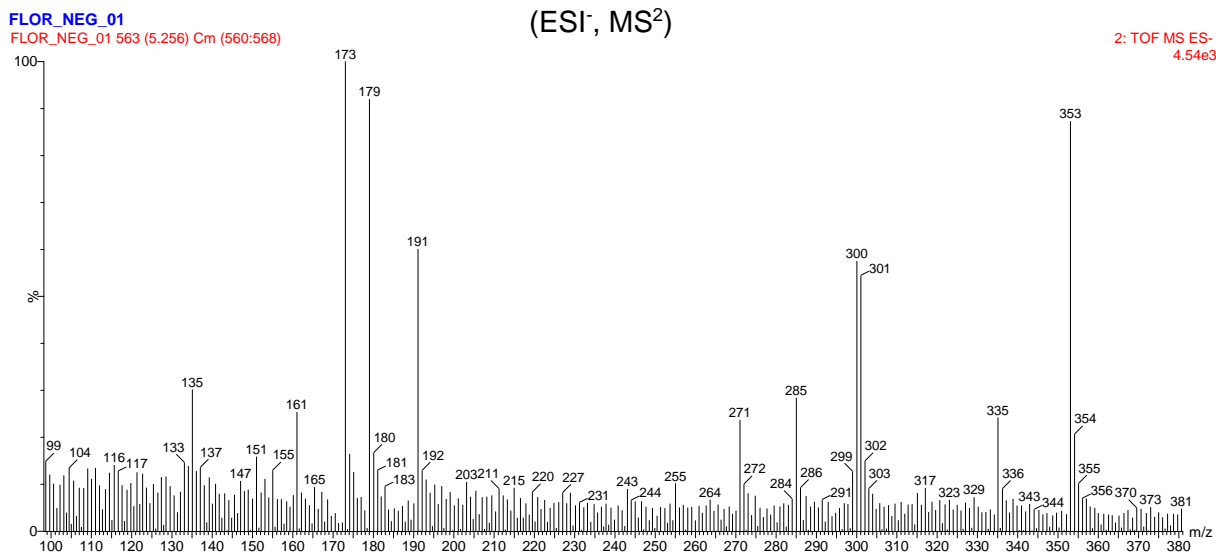
ZIMMERMAM-FRANCO, D.; BOLUTARI, E.; POLONINI, H.; DO CARMO, A.; DAS GRAÇAS A. M. CHAVES, M.; RAPOSO, N. Antifungal activity of *Copaifera langsdorffii* desf oleoresin against dermatophytes. **Molecules**, [s. l.], v. 18, n. 10, 2013.

**Apêndice I.** Cromatogramas LC/UV correspondentes a) quercetina,  $t_R$ : 14,337; ácido 5-O-cafeoilquínico,  $t_R$ : 14,337. b) Extrato de flores. c) Extrato de folhas



**Apêndice II.** Espectros correspondentes às fragmentações (ESI<sup>+</sup>, MS<sup>2</sup>) e espectros UV dos compostos presentes no extrato de flores de *A. saturoioides* obtidos por UPLC-QTOF-MS/MS

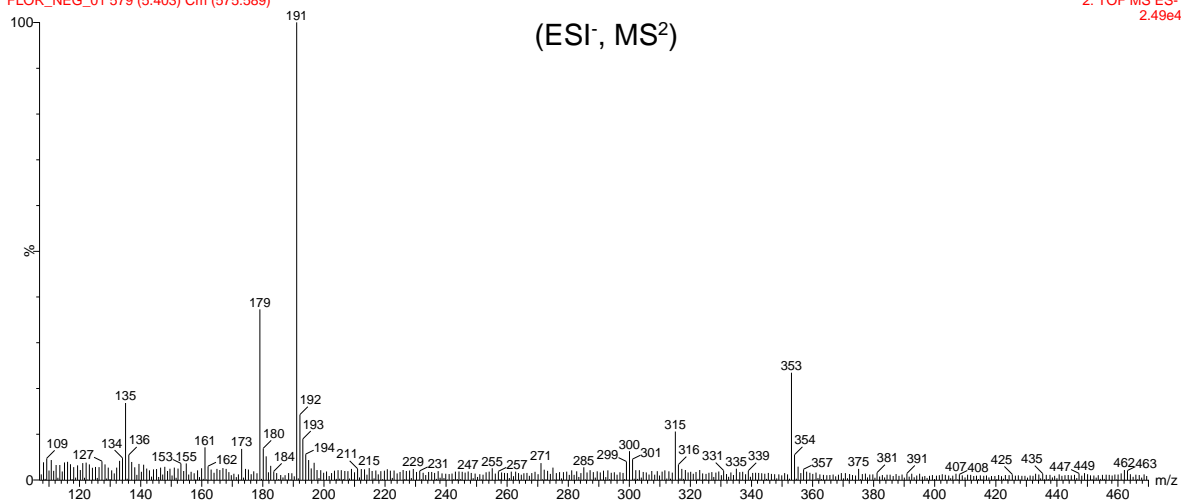
### Pico No1/ tr:5,22



**Pico No2/ tR:5,37**

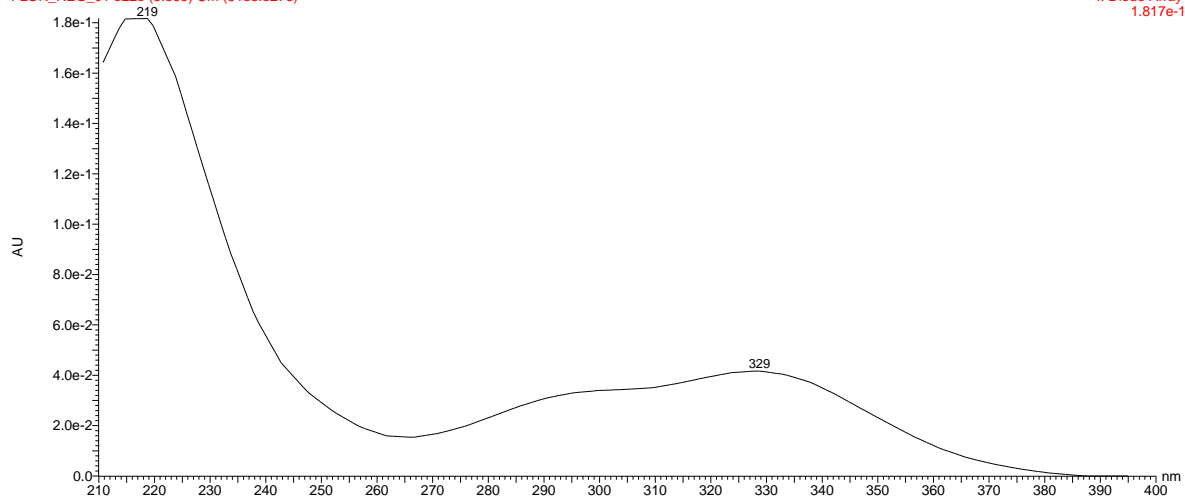
FLOR\_NEG\_01

FLOR\_NEG\_01 579 (5.403) Cm (575:589)

2: TOF MS ES-  
2.49e4

FLOR\_NEG\_01

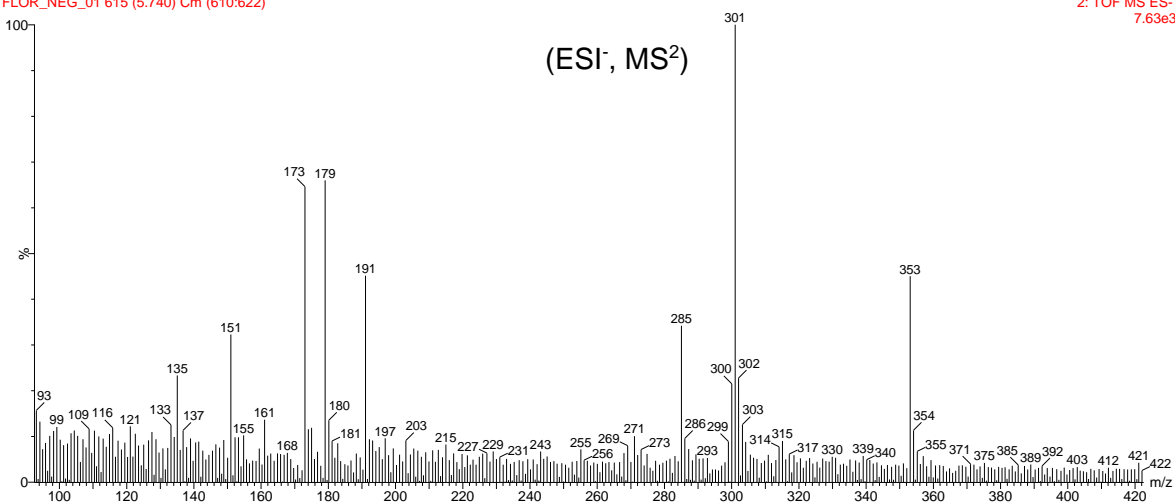
FLOR\_NEG\_01 3220 (5.365) Cm (3188:3276)

4: Diode Array  
1.817e-1

**Pico No3/ tR:5,70**

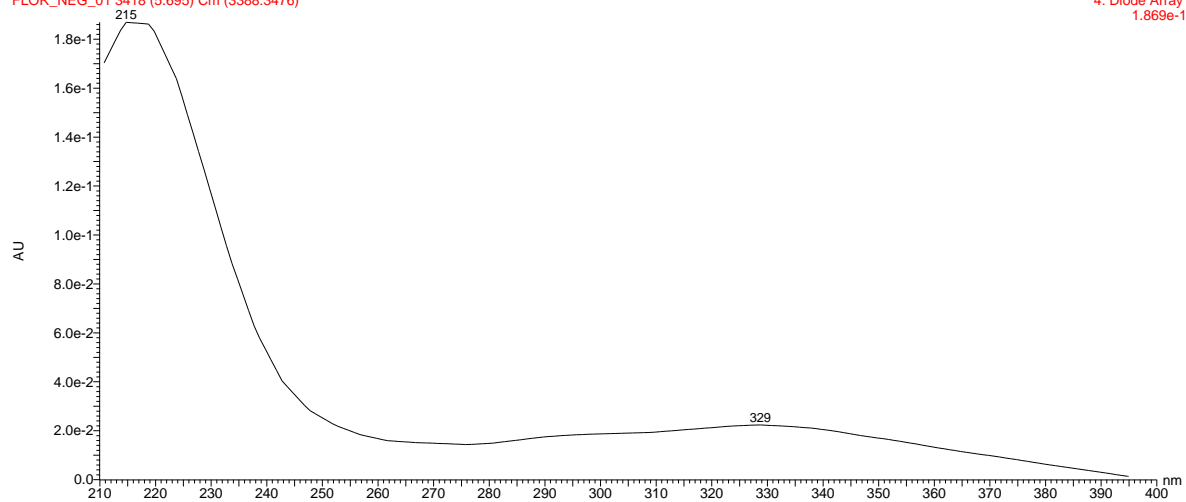
FLOR\_NEG\_01

FLOR\_NEG\_01 615 (5.740) Cm (610:622)

2: TOF MS ES-  
7.63e3

FLOR\_NEG\_01

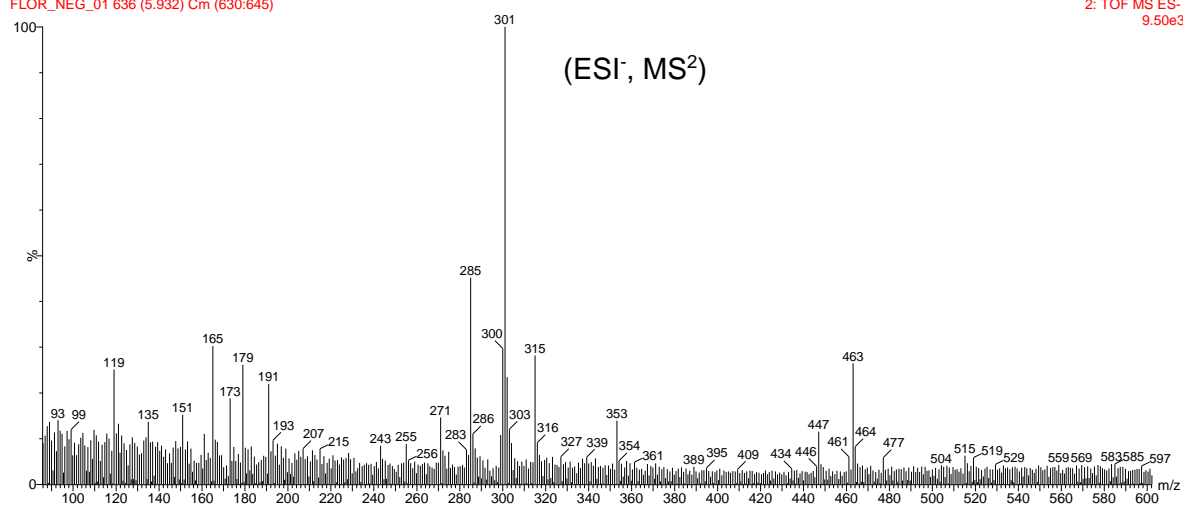
FLOR\_NEG\_01 3418 (5.695) Cm (3388:3476)

4: Diode Array  
1.869e-1

**Pico No4/ tR:5,90**

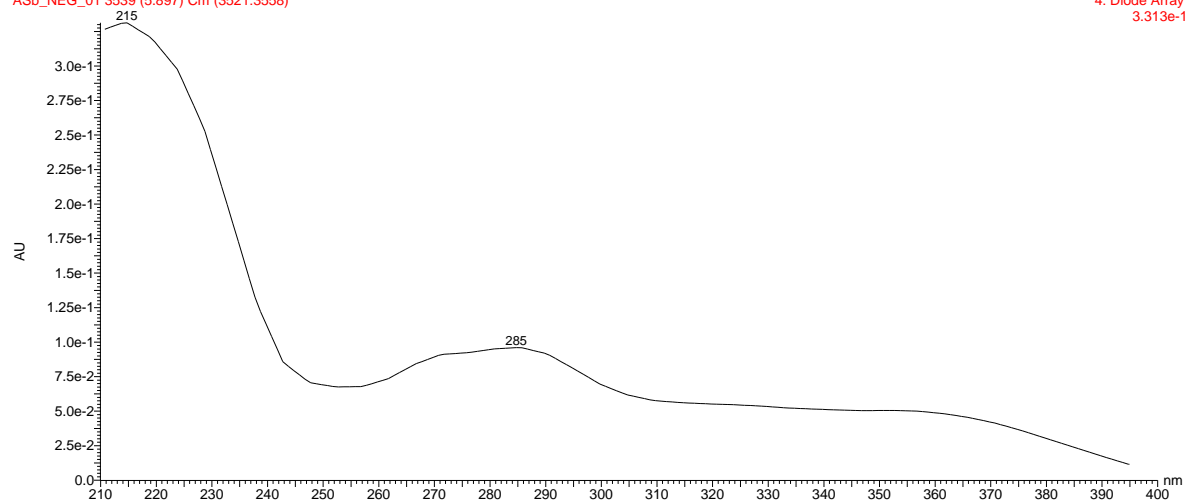
FLOR\_NEG\_01

FLOR\_NEG\_01 636 (5.932) Cm (630:645)

2: TOF MS ES-  
9.50e3

ASb\_NEG\_01

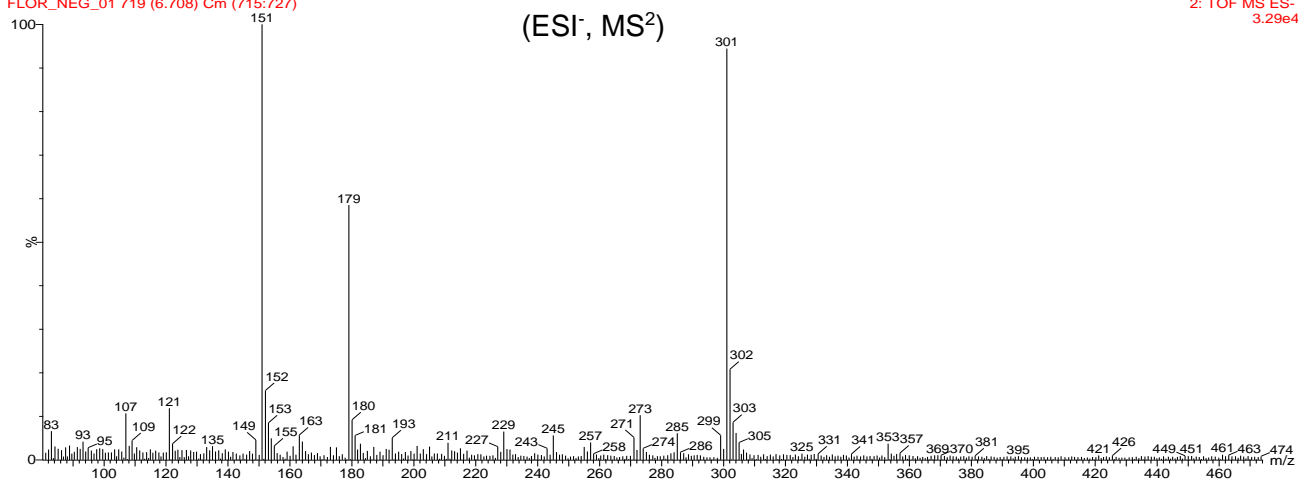
ASb\_NEG\_01 3539 (5.897) Cm (3521:3558)

4: Diode Array  
3.313e-1

## Pico No5/ tR:6,67

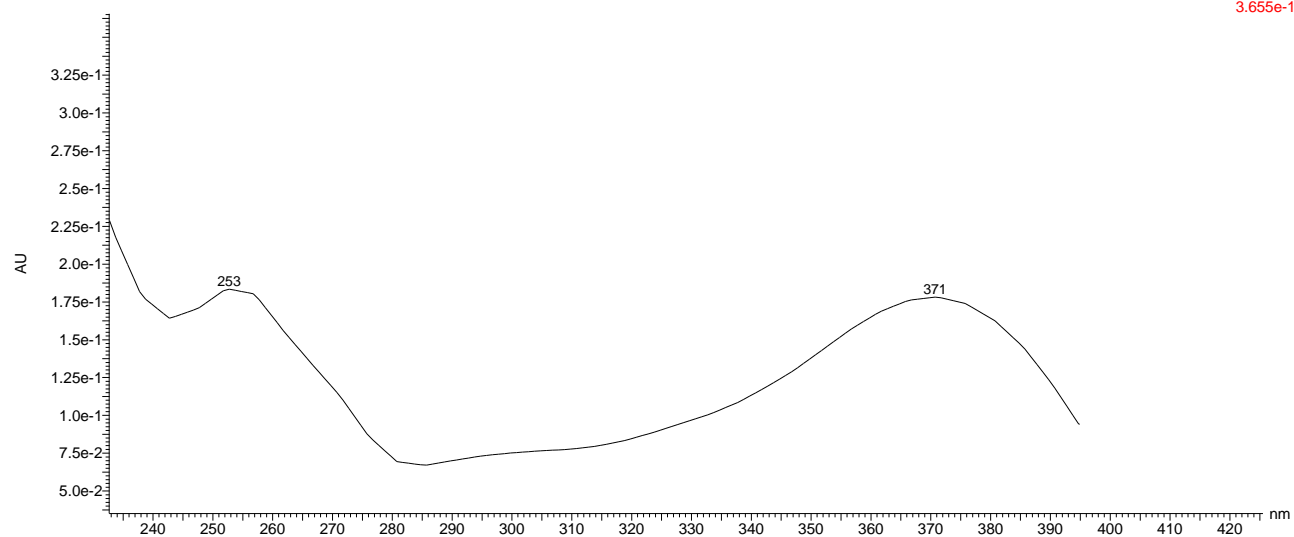
FLOR\_NEG\_01

FLOR\_NEG\_01 719 (6.708) Cm (715:727)

(ESI<sup>-</sup>, MS<sup>2</sup>)2: TOF MS ES-  
3.29e4

FLOR\_NEG\_01

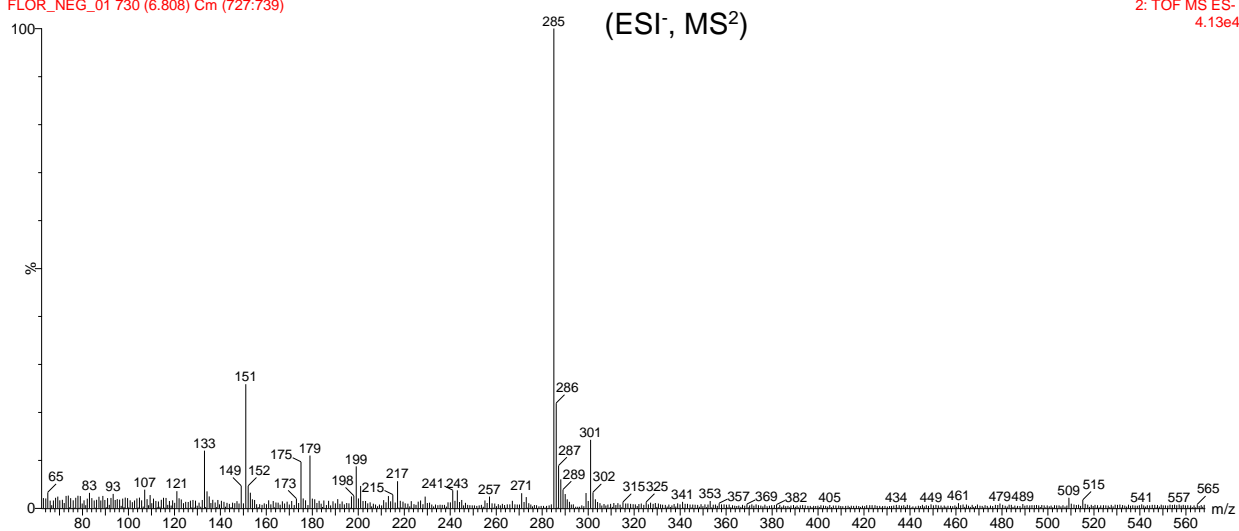
FLOR\_NEG\_01 4005 (6.673) Cm (3983:4046)

4: Diode Array  
3.655e-1

**Pico No6/ tR:6,77**

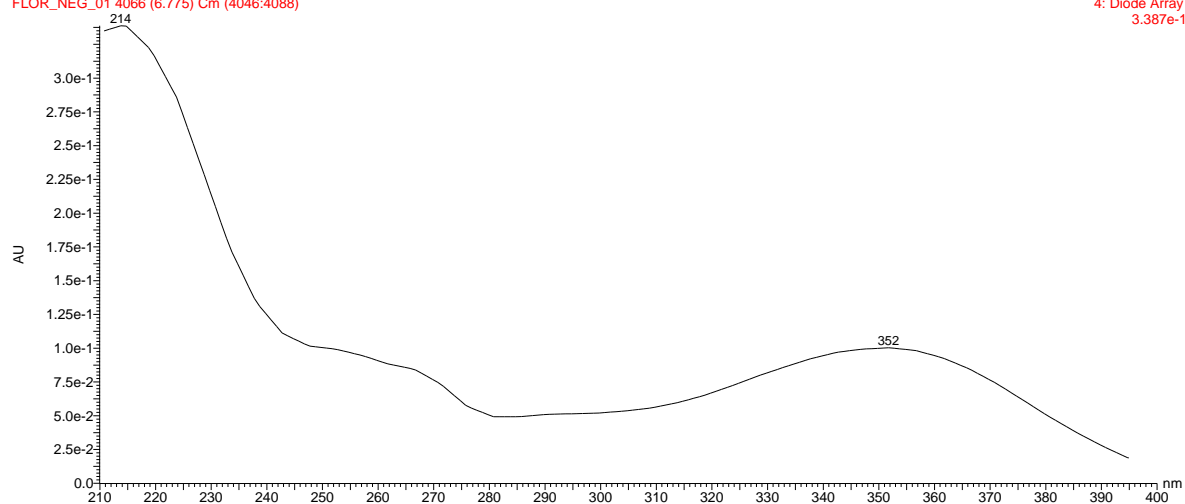
FLOR\_NEG\_01

FLOR\_NEG\_01 730 (6.808) Cm (727:739)

2: TOF MS ES-  
4.13e4

FLOR\_NEG\_01

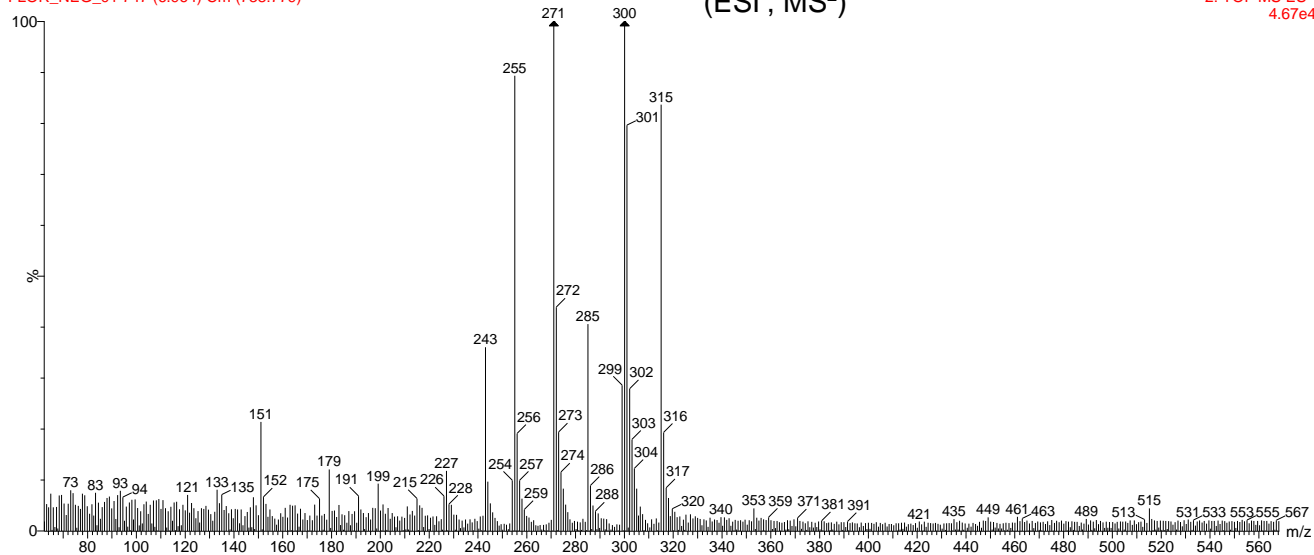
FLOR\_NEG\_01 4066 (6.775) Cm (4046:4088)

4: Diode Array  
3.387e-1

## Pico No7/ tR:6,92

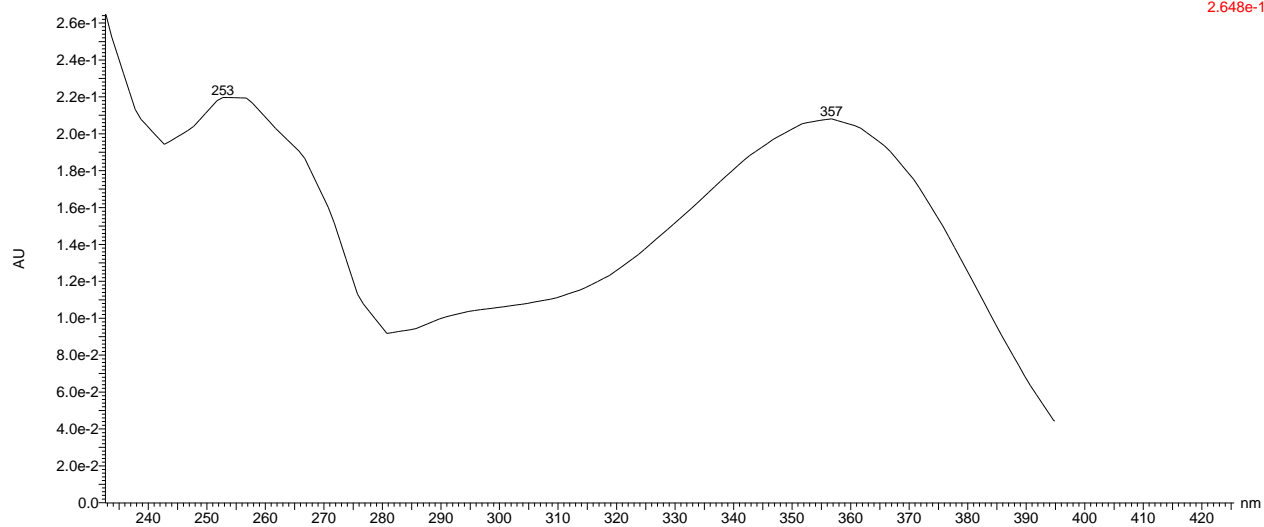
FLOR\_NEG\_01

FLOR\_NEG\_01 747 (6.964) Cm (738:779)

(ESI, MS<sup>2</sup>)2: TOF MS ES-  
4.67e4

FLOR\_NEG\_01

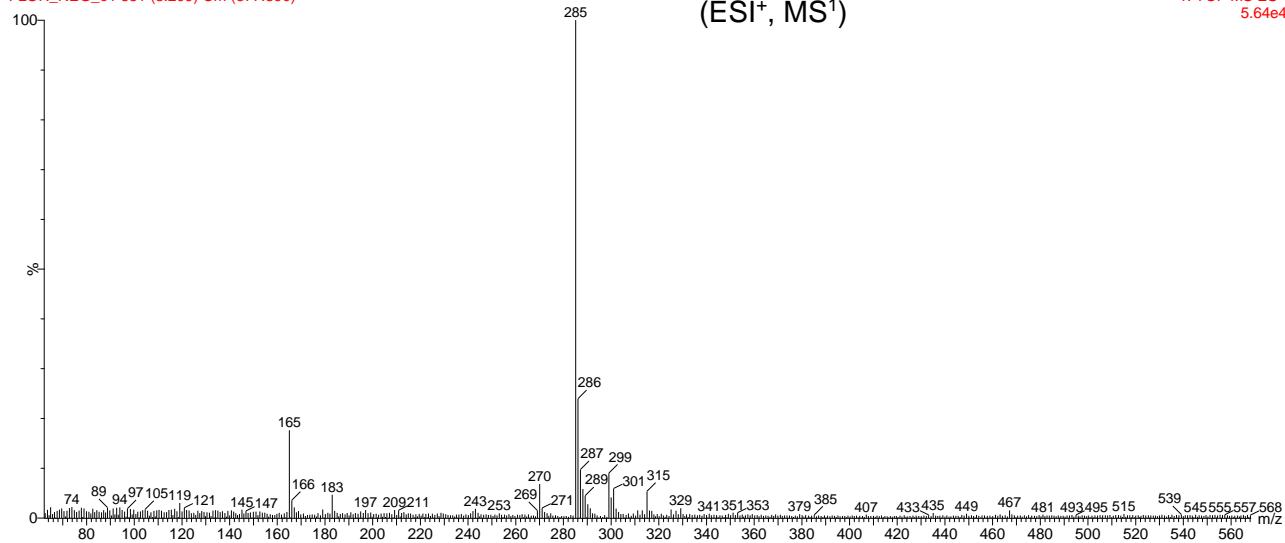
FLOR\_NEG\_01 4155 (6.923) Sm (Mn, 2x0.75); Cm (4125:4210)

4: Diode Array  
2.648e-1

## Pico No8/ tR:8,17

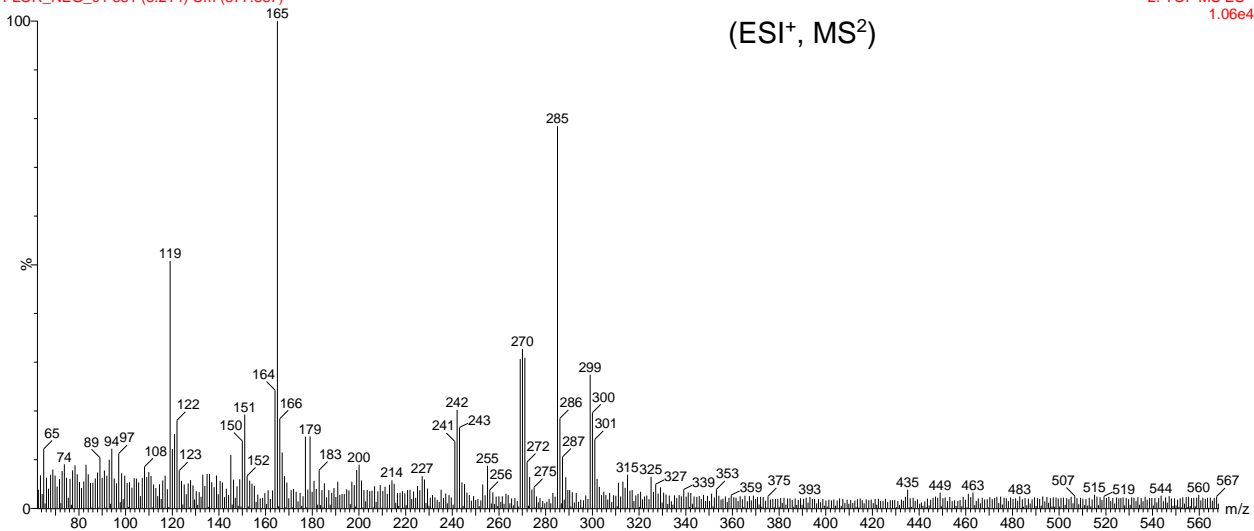
FLOR\_NEG\_01

FLOR\_NEG\_01 881 (8.209) Cm (877:890)

(ESI<sup>+</sup>, MS<sup>1</sup>)1: TOF MS ES-  
5.64e4

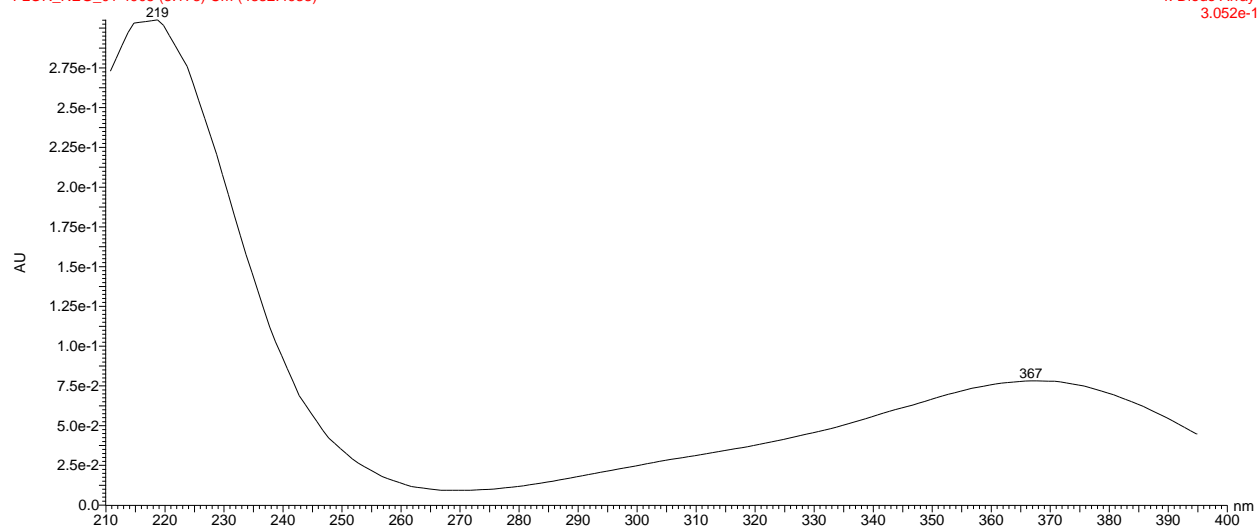
FLOR\_NEG\_01

FLOR\_NEG\_01 881 (8.214) Cm (877:887)

(ESI<sup>+</sup>, MS<sup>2</sup>)2: TOF MS ES-  
1.06e4

FLOR\_NEG\_01

FLOR\_NEG\_01 4905 (8.173) Cm (4882:4933)

4: Diode Array  
3.052e-1

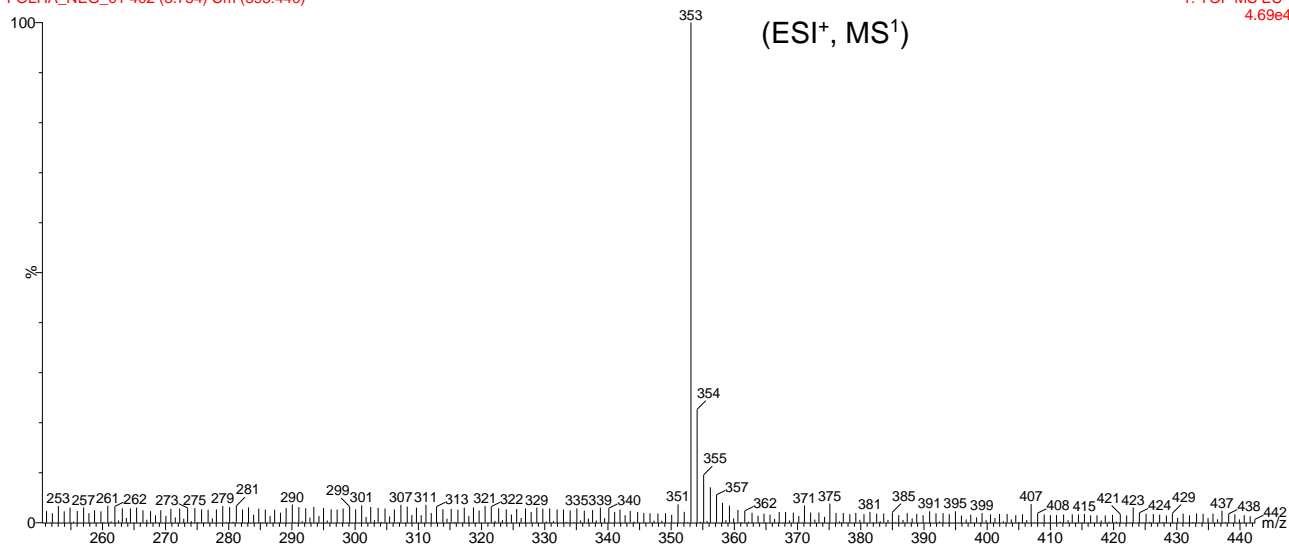
**Apêndice III.** Espectros (ESI<sup>+</sup>, MS<sup>1</sup>), fragmentações (ESI<sup>+</sup>, MS<sup>2</sup>) e espectros UV dos compostos presentes no extrato de folhas de *A. saturoioides* obtidos por UPLC-QTOF-MS/MS

**Pico No1/ tR:3,72**

FOLHA\_NEG\_01

FOLHA\_NEG\_01 402 (3.754) Cm (395:440)

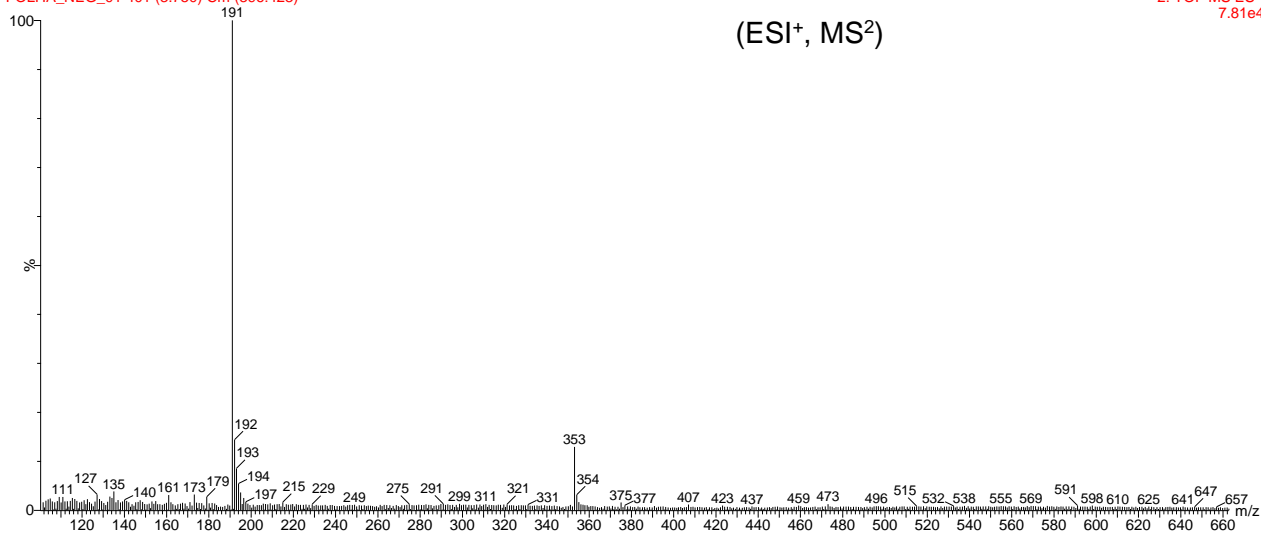
1: TOF MS ES-  
4.69e4



FOLHA\_NEG\_01

FOLHA\_NEG\_01 401 (3.750) Cm (396:423)

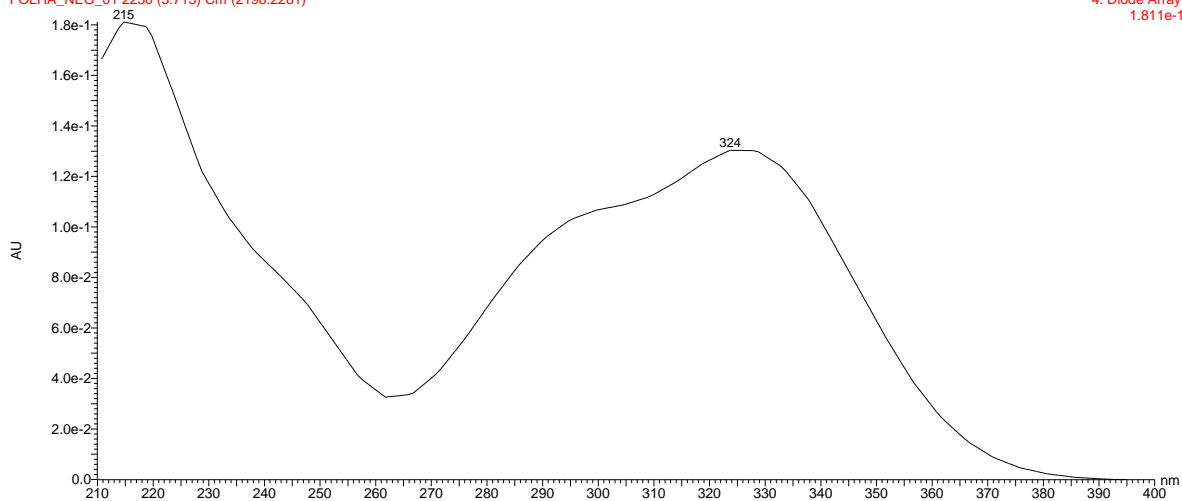
2: TOF MS ES-  
7.81e4



FOLHA\_NEG\_01

FOLHA\_NEG\_01 2230 (3.715) Cm (2198:2281)

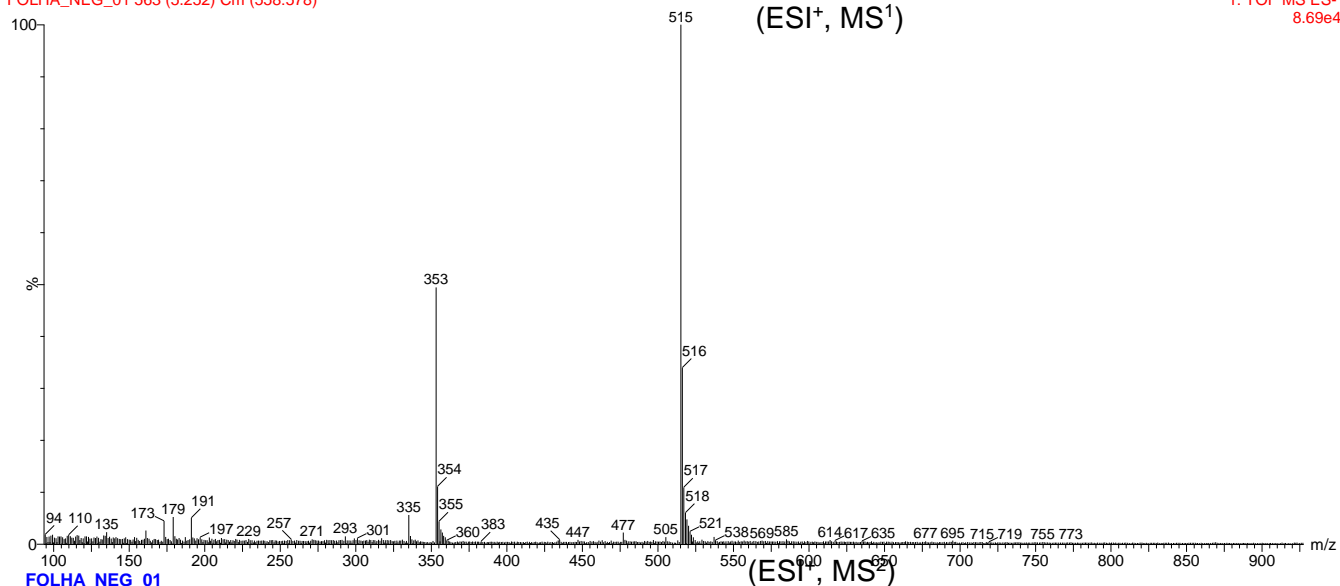
4: Diode Array  
1.81e-1



## Pico No2/ tR:5,21

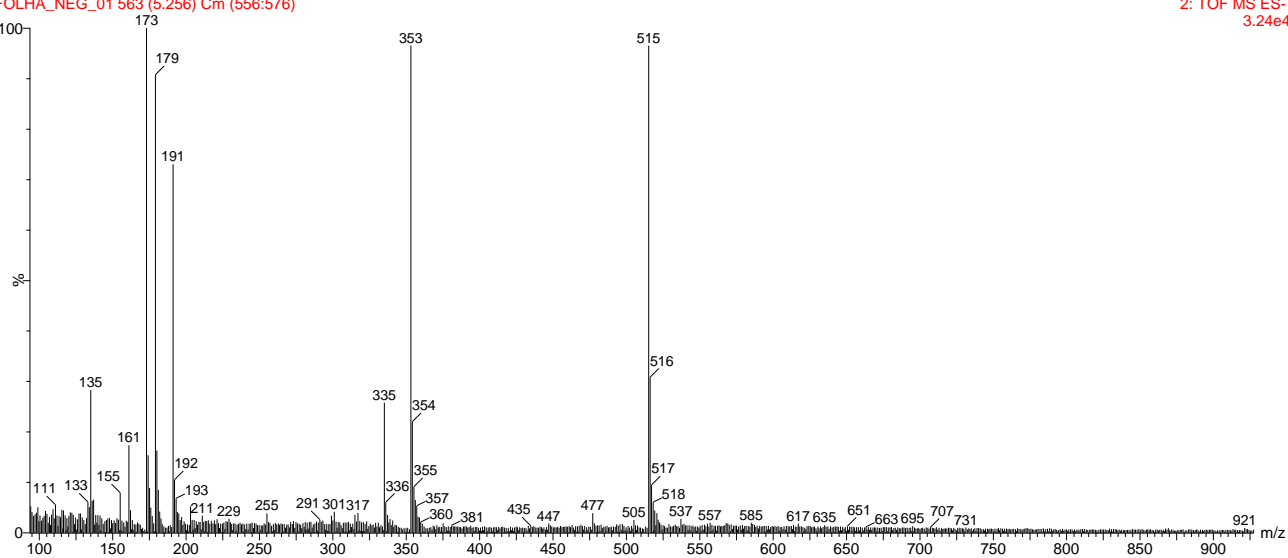
FOLHA\_NEG\_01

FOLHA\_NEG\_01 563 (5.252) Cm (558:578)

1: TOF MS ES-  
8.69e4

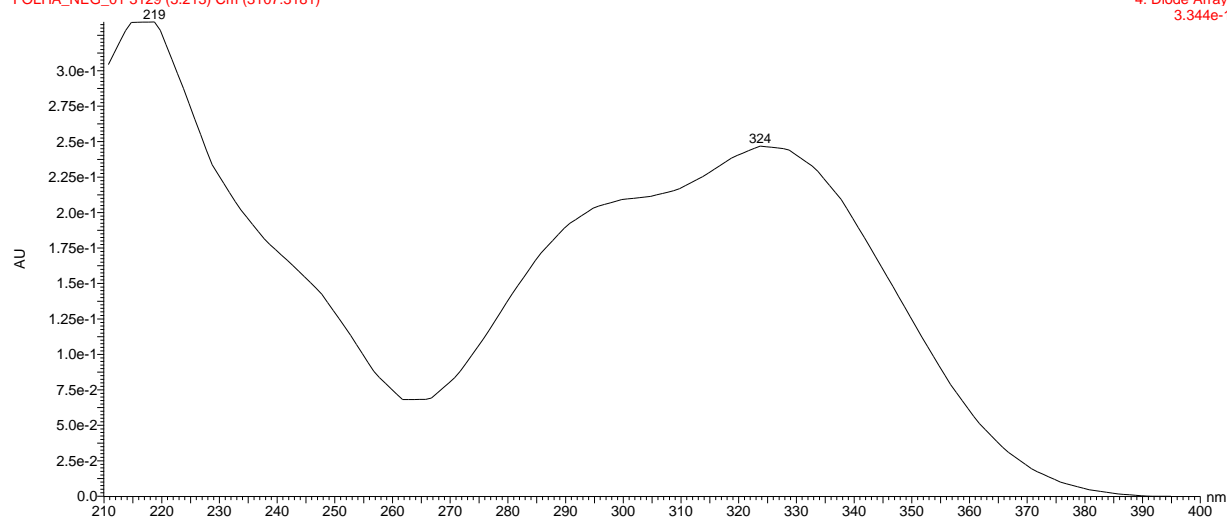
FOLHA\_NEG\_01

FOLHA\_NEG\_01 563 (5.256) Cm (556:576)

2: TOF MS ES-  
3.24e4

FOLHA\_NEG\_01

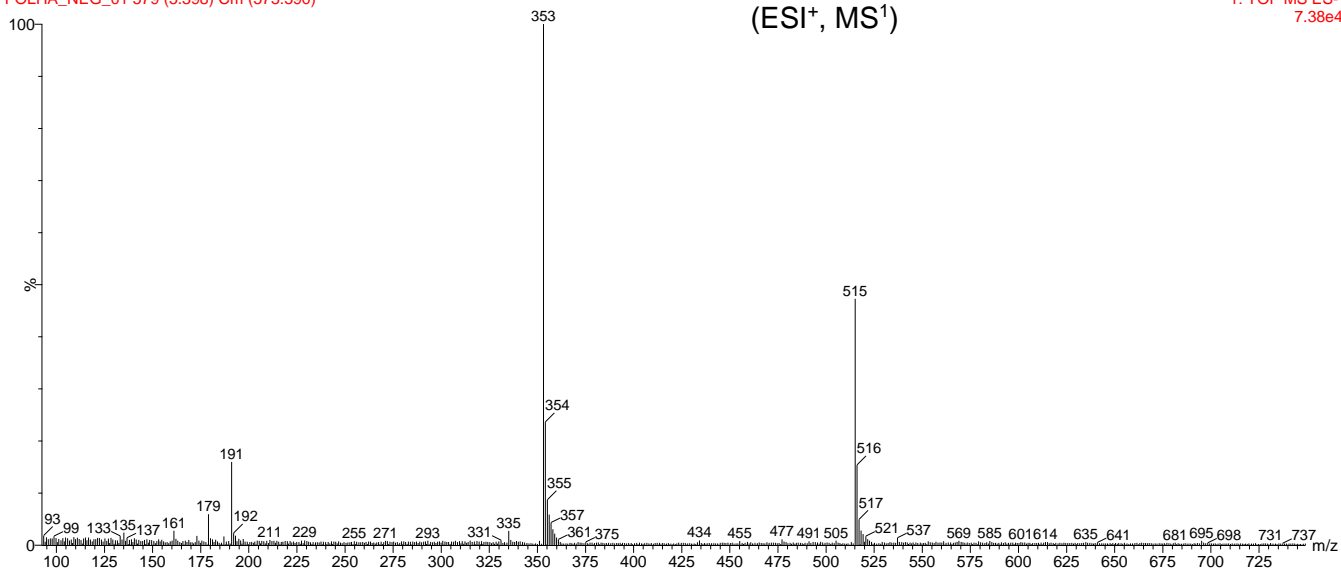
FOLHA\_NEG\_01 3129 (5.213) Cm (3107:3181)

4: Diode Array  
3.344e-1

## Pico No3/ tR:5,36

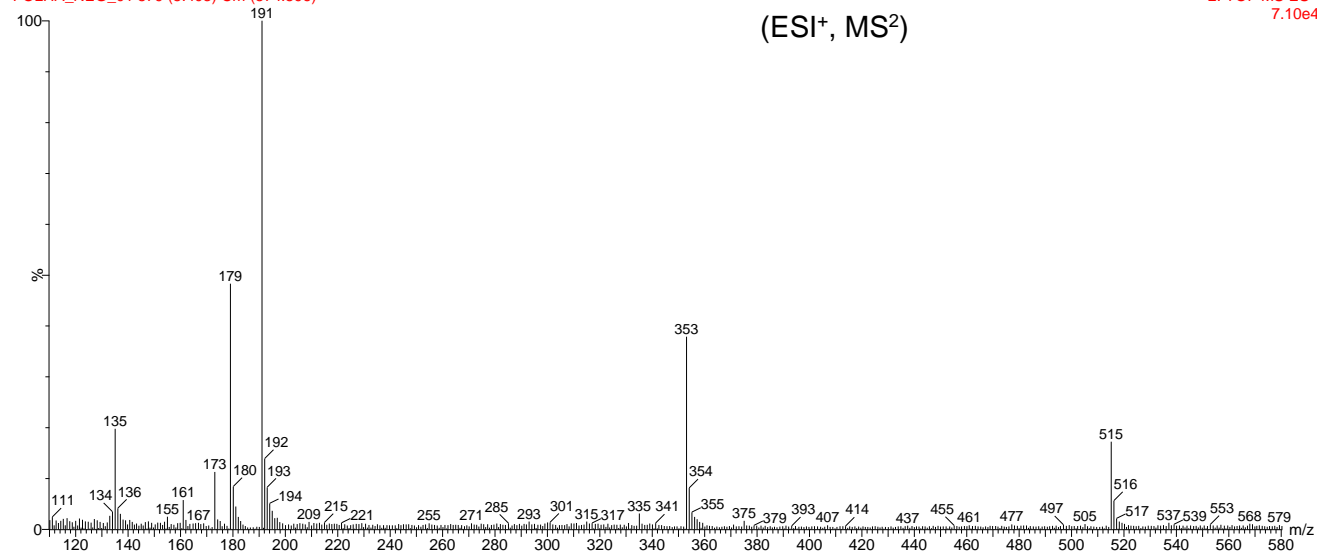
FOLHA\_NEG\_01

FOLHA\_NEG\_01 579 (5.398) Cm (575:590)

1: TOF MS ES-  
7.38e4

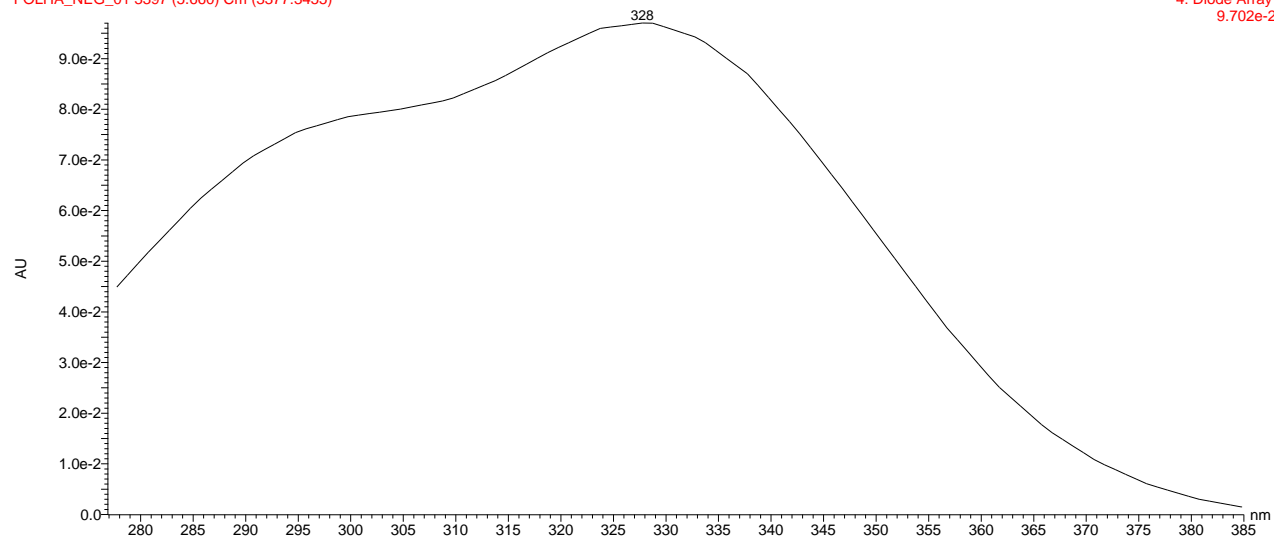
FOLHA\_NEG\_01

FOLHA\_NEG\_01 579 (5.403) Cm (574:596)

2: TOF MS ES-  
7.10e4

FOLHA\_NEG\_01

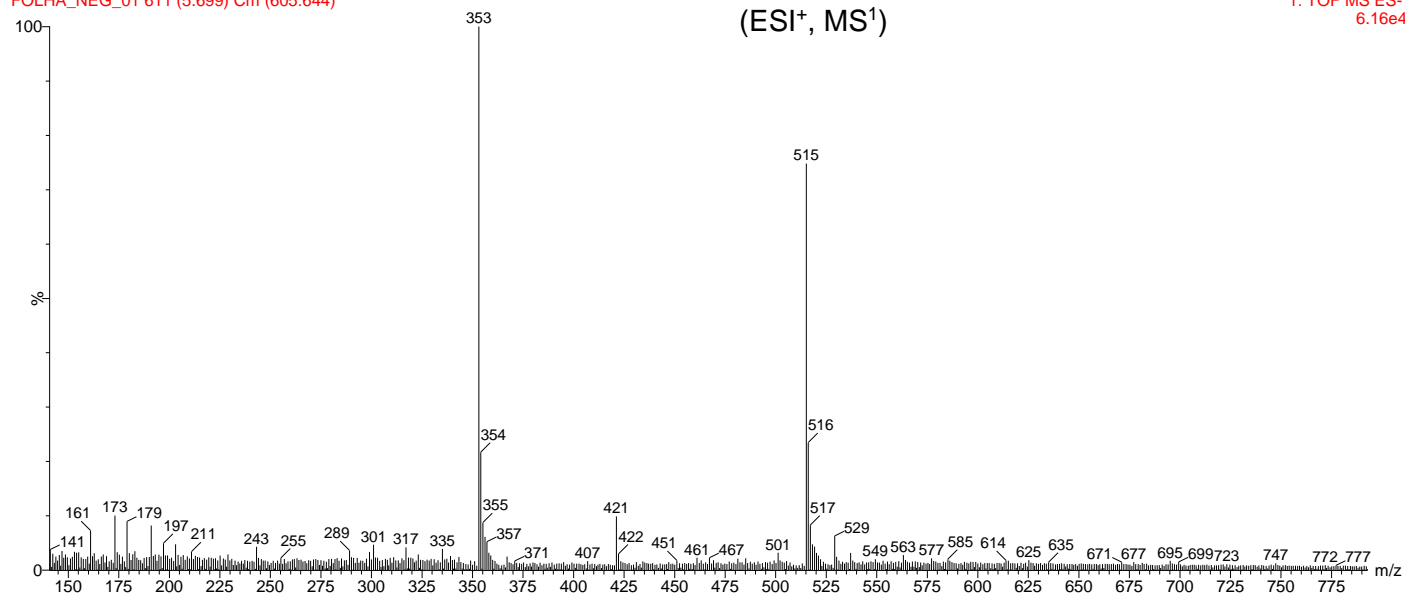
FOLHA\_NEG\_01 3397 (5.660) Cm (3377:3455)

4: Diode Array  
9.702e-2

## Pico No4/ tR:5,66

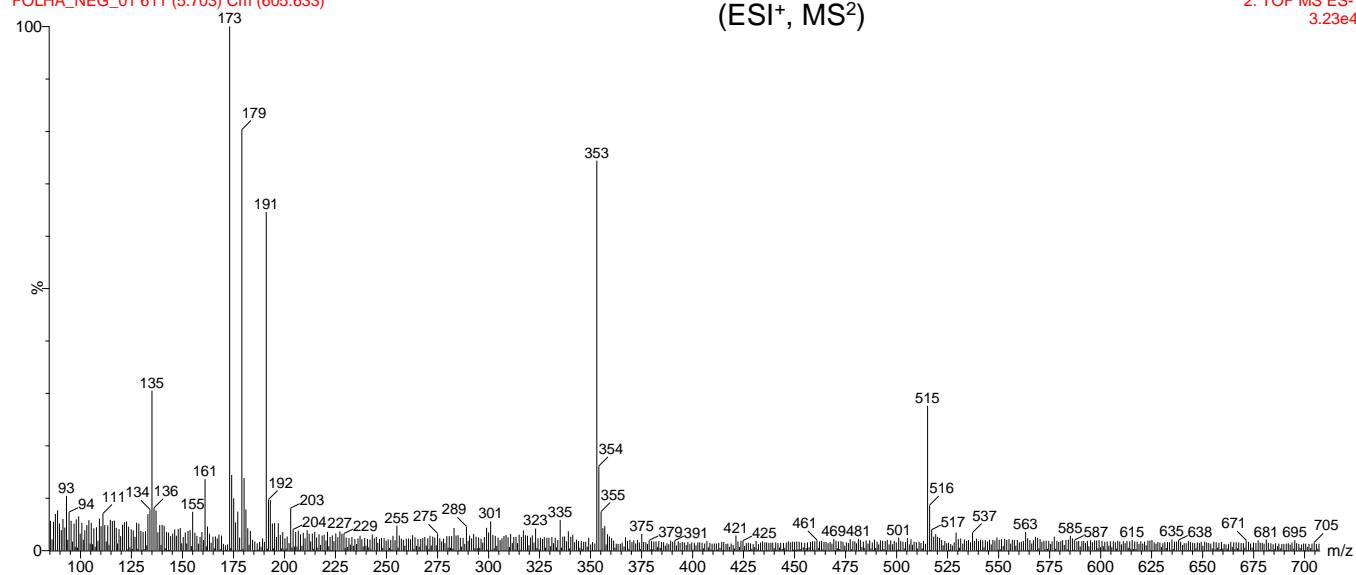
FOLHA\_NEG\_01

FOLHA\_NEG\_01 611 (5.699) Cm (605:644)



FOLHA\_NEG\_01

FOLHA\_NEG\_01 611 (5.703) Cm (605:633)



FOLHA\_NEG\_01

FOLHA\_NEG\_01 3397 (5.660) Cm (3371:3516)

