RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 10/03/2027

Walter Ariel Curti

Desenvolvimento de géis mucoadesivos a base de extratos de própolis, romã e sisal: avaliação antifúngica e anti-inflamatória

ARAÇATUBA - SP

2023

Walter Ariel Curti

Desenvolvimento de géis mucoadesivos a base de extratos de própolis, romã e sisal: avaliação antifúngica e anti-inflamatória

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Odontológica – Área Biomateriais

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Debora Barros Barbosa
Coorientadora: Prof.ª Dr.ª Juliana Issa Hori
Coorientadora: Dr.ª Thaila Fernanda dos Reis

ARAÇATUBA - SP
2023

Catalogação na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

C978d

Curti, Walter Ariel.
Desenvolvimento de géis mucoadesivos a base de extratos de própolis, romã e sisal: avaliação antifúngica e anti-inflamatória / Walter Ariel Curti. - Araçatuba, 2023
113 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Debora Barros Barbosa
Coorientadora: Profa. Juliana Issa Hori
Coorientadora: Profa. Thaila Fernanda dos Reis

1. Romã (Fruta) 2. Própole 3. Agave 4. Candidíase 5. Inflamação I. T.

Black D15
CDD 617.6

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Dados Curriculares

WALTER ARIEL CURTI

Nascimento	28/04/1994 Palmeira d'Oeste - SP
Filiação	Valter Ricci Curti Sandra Lucia Biot
2014/2021	Curso de Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA / UNESP
2020/2021	Curso de Pós-Graduação – Aperfeiçoamento em Implantodontia – Salutti Educacional
2020/Atual	Curso de Pós-Graduação em Ciências – área Biomateriais, nível de Mestrado, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA / UNESP
Associações	CROSP - Conselho Regional de Odontologia de São Paulo

Dedicatória

Dedicatória

A minha mãe, Sandra Lucia Biot

Dedico esta Dissertação a você, a grande razão de todas minhas conquistas. Agradeço por todas as vezes que deixou de viver seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus, gostaria de agradecer ao esforço incessante que fez para que eu pudesse ter uma vida melhor apesar de todas adversidades.

Essa conquista é sua.

Aos meus avós, Olinda Pinto Ferreira Biot e Santo Biot (in memorian)

Minha saudade eterna.

Agradecimentos Especiais

A Deus

“Porque Dele, e por Ele, e para Ele, são todas as coisas; glória, pois, a Ele eternamente. Amém.” (Romanos 11:36)

À minha família

Por estarem amorosamente perto, mesmo que fisicamente distantes. Agradeço pelo apoio ao longo da minha jornada

À minha orientadora, Prof.ª Ass. Dr.ª Debora Barros Barbosa

Agradeço com muita gratidão toda atenção e paciência que você dedica a mim desde a minha graduação. Obrigado pela orientação e pela enorme oportunidade de aprendizado que me proporcionou.

Seu jeito simples, descontraído e calmo de orientar, e sua paixão pela pesquisa com certeza tornaram a realização deste trabalho uma grande oportunidade de crescimento profissional e pessoal para mim.

Professora, muito obrigada acima de tudo pela sua amizade.

A você, minha gratidão e profunda admiração.

À minha co-orientadora *Dr.ª Thaila Fernanda dos Reis*

Obrigado por toda colaboração no projeto, por me ensinar novos conceitos e metodologias. Sua Jornada como empreendedora e cientista é admiravel. Te ter como coorientadora e professora durante a pós-graduação foi uma honra. Sem você esse projeto não seria possível.

À minha co-orientadora Prof.ª Dr.ª Juliana Issa

Obrigado por compartilhar seu conhecimento, agradeço por toda colaboração no projeto.

À banca examinadora

Obrigado por aceitar o meu convite, tenho certeza que todas as considerações serão extremamente importantes para enriquecer ainda mais o nosso trabalho.

Walter Ariel Curti

Ao meu companheiro Guilherme Fonseca Fulaneti.

Por toda a cumplicidade e apoio incondicional. Não dividimos somento o mesmo teto, mas compartilhamos sonhos.

Obrigado por sempre estar ao meu lado.

Aos meus amigos Paula e Rodolfo

Por serem amigos/irmãos.

Desejo que sejam muito felizes, e que trilhem um caminho lindo na odontologia.

Obrigado por todos esses anos de amizade e companheirismo e por sempre se fazerem presentes.

Ao servidor técnico Jander

Por todos os ensinamentos em laboratório, clínica e na vida, por sua paciência, dedicação e bom humor.

Obrigado por esses anos de convívio que se consolidaram amizade.

Agradecimentos

Walter Ariel Curti

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP
na pessoa de seu diretor **Prof. Tit. Glauco Issamu Miyahara**, pela oportunidade de aprendizado e crescimento pessoal e profissional.

Ao coordenador do Programa de Pós-graduação em Ciências da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP

Prof. Assoc. Juliano Pelim Pessan, pelo trabalho, competência e acessibilidade.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (UNESP)
a todos seus docentes e discentes.

A empresa Apis Flora Industrial e Comercial Ltda
Em nome de sua Farmacêutica Responsável e Gerente de PD&I Andresa Aparecida Berreta por toda a ajuda e empenho no desenvolvimento desse trabalho. Toda a minha gratidão ao Felipe Moreira Buszinski, por ser um farmacêutico extremamente competente, a essa empresa e todos os seus funcionários toda a minha admiração e gratidão.

À Faculdade de Ciências e Letras - Câmpus de Assis – UNESP
em especial, a Profª. Drª. Lucinéia dos Santos.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP
na pessoa do **Prof. Tit. Gustavo Henrique Goldman**, por tão gentilmente ceder as dependências de seus laboratórios e equipamentos de pesquisa para realização dos ensaios microbiológicos.

Ao Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP
aos professores e funcionários pelo convívio tão agradável.

Walter Ariel Curti

Às funcionárias da seção de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP

Cristiane e Maria Clara,

pela presteza, apoio e suporte durante todo esse tempo.

Meu muito obrigado!

Epígrafe

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”

Simone de Beauvoir

Resumo

CURTI, W.A. **Desenvolvimento de géis mucoadesivos a base de extratos de própolis, romã e sisal: avaliação antifúngica e anti-inflamatória.** 2023. Dissertação (Mestrado em Ciências, área de Biomateriais) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 2023.

RESUMO

Esse trabalho se propôs a desenvolver géis mucoadesivos contendo extratos naturais de própolis, casca de romã e/ou sisal e avaliar a atividade antifúngica e anti-inflamatória contra cepas de referência oral e vaginal em ensaios *in vitro.* Os extratos foram produzidos e caracterizados por meio de análise de *fingerpint* e a quantificação dos principais componentes presentes por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para o extrato de própolis uma alta concentração de artepillin C o principal marcador da propolis verde foi observada, Já para nos extratos de romã analisados foi encontrada uma expressiva concentração de ácido elágico nas matrizes. O potencial antifúngico desses extratos contra as cepas de referência de *Candida albicans* (ATCC 10231 ou SC 5314) foi avaliado por meio do método da microdiluião em caldo, difusão em ágar e halo de inibição onde apresentaram interessante ação antifúngica. Não foi possível determinar o CIM (concentração inibitória mínima) do extrato de própolis devido a sua turbidez, já seu CFM (concentração fungicida mínimo) foi de 10 mg/mL, já o extrato de romã apresentou um CIM de 1,56 mg/mL entretanto seu CFM foi de 25 mg/mL, sugerindo que ele possua uma ação parcial fungida, em relação ao extrato de sisal, o mesmo obteve um valor de 0,125 mg/mL para CIM e CFM exibindo inreressante ação antifúngica para as cepas. Quando associados, os extratos de própolis apresentaram ação antagônica, sendo necessário o desenvolvimento de um sistema de nanoemulsão para proteção do extrato de própolis para o desenvoilvimento dos géis. Em relação ao efeito anti-inflamatório dos extratos de própolis, romã e sisal isolados utilizou-se macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) de camundongospara os ensaios, que apresentaram um perfil pró inflamatório e redução da viabilidade celular de maneira dose dependente. Os géis mucoadesivos foram produzidos contendo extratos isolados e combinados. Essas formulações apresentaram efeito antifúngico em ensaios de difusão em ágar e incorporação do gel mucoadesivo em meio de cultura. Também apresentaram ação anti-inflamatória sem danos a viabilidade celular dos

macrófagos (BMDMs).Diante dos resultados encontrados foi possível concluir que essas formulações apresentam potencial para o desenvolvimento de um produto comercial para tratamento de candidoses.

Palavras-chave: Romã (fruta); Própole; Agave; Candidíase; Inflamação I.T

Abstract

CURTI, W.A. **Development of mucoadhesive gels based on propolis, pomegranate and sisal extracts: antifungal and anti-inflammatory evaluation.** 2023. Dissertação (Mestrado em Ciências, área de Biomateriais) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 2023.

Abstract

This work aimed to develop mucoadhesive gels containing natural extracts of propolis, pomegranate peel and/or sisal and to evaluate the antifungal and anti-inflammatory activity against oral and vaginal reference strains in in vitro assays. The extracts were produced and characterized by means of fingerpint analysis and quantification of the main components present by high performance liquid chromatography (HPLC). For the propolis extract, a high concentration of artepillin C, the main marker of green propolis, was observed. For the analyzed pomegranate extracts, a significant concentration of ellagic acid was found in the matrices. The antifungal potential of these extracts against reference strains of Candida albicans (ATCC 10231 or SC 5314) was evaluated using the method of microdilution in broth, diffusion in agar and inhibition halo, where they showed interesting antifungal action. It was not possible to determine the MIC (minimum inhibitory concentration) of the propolis extract due to its turbidity, since its MFC (minimum fungicidal concentration) was 10 mg/mL, while the pomegranate extract had a MIC of 1.56 mg/mL however, its CFM was 25 mg/mL, suggesting that it has a partial fungicidal action, in relation to the sisal extract, it obtained a value of 0.125 mg/mL for CIM and CFM, showing interesting antifungal action for the strains. When associated, the propolis extracts showed antagonistic action, requiring the development of a nanoemulsion system to protect the propolis extract for the development of the gels. Regarding the anti-inflammatory effect of isolated propolis, pomegranate and sisal extracts, mouse bone marrow-derived macrophages (BMDMs) were used for the assays, which showed a pro-inflammatory profile and dose-dependent reduction in cell viability. Mucoadhesive gels were produced containing isolated and combined extracts. These formulations showed antifungal effect in agar diffusion tests and incorporation of the mucoadhesive gel in culture medium. They also showed anti-inflammatory action without damage to macrophage cell viability (BMDMs). Given the results found, it was possible to conclude that these formulations

have potential for the development of a commercial product for the treatment of candidiasis.

Keywords: *Pomegranate (fruit); Propolis; Agave; Candidiasis; IT inflammation*

Lista de Tabelas

Lista de tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Avaliação dos valores de CIM dos extratos de própolis, romã e sisal.	50
Tabela 2	Avaliação dos valores de CIM do extrato de sisal na presença de óleo de rícino etoxilado ou tween 80.	62
Tabela 3	Composição da nanoemulsão de própolis.	63

Lista de Figuras

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	*Workflow* do desenvolvimento do trabalho.	41
FIGURA 2	Perfil cromatrográfico do extrato glicólico de própolis.	47
FIGURA 3	Perfis cromatográficos dos compostos de romã.	49
FIGURA 4	Análise da atividade antifúngica de extratos naturais de própolis, romã e sisal em culturas de células de *C. albicans*	51
FIGURA 5	Análise da viabilidade fúngica definidos por UFC após tratamento com os extratos naturais de própolis, romã e sisal.	53
FIGURA 6	Análise da atividade antifúngica sinérgica entre sisal e romã em culturas de células de *C. albicans.*	55
FIGURA 7	Análise da atividade antifúngica sinérgica entre os extratos de própolis e romã em culturas de células de *C. albicans.*	57
FIGURA 8	Análise da atividade antifúngica sinérgica entre própolis e sisal em culturas de células de *C. albicans.*	59
FIGURA 9	Análise da atividade antifúngica sinérgica entre os extratos de própolis e sisal em culturas de células de *C. albicans.*	60
FIGURA 10	Análise da atividade antifúngica do extrato natural de sisal frente a células de *C. albicans* após solubilização em óleo de rícino etoxilado e tween 80.	63
FIGURA 11	Análise da atividade antifúngica de formulações contendo extrato de própolis protegido em poloxamer 407.	66
FIGURA 12	Análise da atividade antifúngica de formulações contendo extrato de própolis romã e sisal	68
FIGURA 13	Avaliação antifúngica de géis mucoadesivo contendo extratos de romã, sisal e própolis ou romã e sisal	71
FIGURA 14	Halos de inibição promovidos pela presença dos extratos naturais de romã, sisal e própolis.	72
FIGURA 15	Halos de inibição promovidos pela presença de géis mucoadesivos contendo extratos naturais de romã, sisal e própolis.	74
FIGURA 16	Avaliação da atividade antifúngica de géis mucoadesivos contendo extrato de romã, sisal e/ou própolis em ensaio de incorporação dos	77

géis em meio de cultura sólido.

FIGURA 17 Avaliação da atividade antifúngica de géis mucoadesivos contendo extrato de romã, sisal e/ou própolis com adição de sorbato de potássio. 80

FIGURA 18 Avaliação da viabilidade celular de macrófagos por ensaio MTT após tratamento com os extratos de própolis, romã e sisal. 82

FIGURA 19 Avaliação da atividade anti-inflamatória após tratamento com LPS por 3 horas e tratamento por 1 hora com extratos de própolis, romã e sisal. 83

FIGURA 20 Avaliação da toxicidade celular de macrófagos por ensaio MTT após tratamento com os géis contendo extratos de própolis, romã e sisal associados. 84

FIGURA 21 Avaliação da atividade anti-inflamatória após tratamento com LPS por 3 horas e tratamento por 1 hora com géis contendo extratos de própolis, romã e sisal associados. 85

Lista de Abreviaturas e Símbolos

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

40OE	Óleo de rícino hidrogenado e etoxilado
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
BDMS	Macrófagos dericados de medula óssea
BHI	Brain Heart Infusion
CFM	Concentração fungicida mínima
CFU(s)	Unidade formadora de colnia
CLAF	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
cm^2	centímetro quadrado
CMC	Carboximetilcelulose
CO_2	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
EPP-AF®	Extrato Alcoólico Padronizado de Própolis
h	Hora
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo
CIM	Concentração inibitória mínima
CFM	Concentração fungicida mínima
min	Minuto
mL	Mililitro
MOPS	ácido 3-[Nmorfolino] propanosulfônico
MTT	brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
nm	Nanômetro/Nanometer
ºC	Graus Celsius/Degrees Celsius
p/v	Peso por volume
PBS	Tampão salino tamponado com fosfato
Pdr1	regulador transcricional de uma rede pleiotrópica de resistência a drogas
pH	Potencial Hidrogeniônico
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
Tween 80	Celulose polisorbato
UFC(s)	Unidades Formadoras de Colônias

Lista de Abreviaturas e Símbolos

UNESP	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
USP	Universidade de São Paulo
v/v	Volume por volume
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
µm	Micrômetro

Sumário

Sumário

SUMÁRIO

TÍTULO	02
RESUMO	14
INTRODUÇÃO	32
OBJETIVOS	36
MATERIAL E MÉTODOS	37
RESULTADOS	46
DISCUSSÃO	85
CONCLUSÃO	90
REFERÊNCIAS	91
ANEXOS	100

1 INTRODUÇÃO

A mucosa humana é habitada por microrganismos que compõem a microbiota autócne. Foi demonstrado que a associação da microbiota com o corpo humano afeta a fisiologia, imunidade e nutrição humanas (KAU et al. 2011; CHEN et al. 2015 e CONLON e BIRD, 2015).

A microbiota residente é composta por bactérias, fungos, vírus, arquéias e protozoários (DEO e DESHMUKH, 2019). Embora em humanos saudáveis a microbiota tenda a ficar em equilíbrio e seja inofensiva, em circunstâncias em que a imunidade do hospedeiro é prejudicada, muitos microrganismos oportunistas podem se tornar um patógeno capaz de romper barreiras mucosas, causando infecção disseminada profundamente invasiva e com risco de vida. Atualmente, os estudos sobre um microbioma residente estão restritos principalmente ao bacterioma (ZAURA et al., 2014). Até o momento, estudos de microbioma indicam que mais de 700 espécies de bactérias colonizam a cavidade oral humana (ZHAO, et al., 2017).

Embora haja poucos relatos sobre o microbioma fúngico, é importante enfatizar que as infecções fúngicas desempenham um papel importante no ambiente hospitalar, principalmente nos pacientes de alto risco (hospedeiros imunocomprometidos ou debilitados). Por exemplo, *Candida* spp. surgiram como patógenos relevantes no ambiente hospitalar, sendo a quarta causa mais comum de infecções nosocomiais da corrente sanguínea em todo o mundo (DELAVY et al., 2019).

O gênero *Candida* é composto por centenas de espécies de fungos que abrigam fungos comensais a patogênicos (BROWN et al., 2012. Entre as espécies de *Candida*, *Candida albicans* é o patógeno mais prevalente responsável por infecções, (responsável por 50 a 70% das candidíases invasivas, sendo as orais e vaginais), seguido por *Candida glabrata*, a segunda causa mais comum de candidose mucosa e invasiva em humanos (VERMITSKY e EDLIND (2004); RODRIGUES et al., 2014; YAPAR, 2014; TSCHERNER et al., 2011; HUFFNAGLE et al., 2013; HALLEN-ADAMS et al., 2017; SANGUINETTIi et al., 2015; AZIE et al., 2012; WISPLINGHOFF et al., 2004; EDMOND et al., 1999 e KHATIB et al., 2016). Outras espécies como

Candida tropicalis, prevalente em infecções do trato urinário (RHO et al., 2004), e *Candida parapsilosis*, um importante agente causador de infecções relacionadas a cateteres (BONASSOLI et al., 2005 e YAPAR et al., 2014) podem ser apontadas.

Candida spp. pode desenvolver uma variedade de aspectos clínicos, variando de infecção superficial a candidemia sistêmica. Em hospedeiros saudáveis, *C. albicans*, por exemplo, é tipicamente assintomático, podendo proliferar e causar infecções circunscritas na pele, unhas e mucosas (EGGIMANN et al., 2003). No entanto, em hospedeiros imunocomprometidos ou prejudicados, *C. albicans* pode se comportar como um patógeno agressivo, causando manifestações clínicas. (EGGIMANN et al., 2003; GUDLAUGSSON et al., 2007 e WEY et al., 1988).

Os tratamentos de infecções fúngicas, incluindo candidíase e candidemia, são restritos devido à disponibilidade de classes limitadas de medicamentos antifúngicos (PERLIN, 2015). Existem quatro classes principais de drogas aplicadas a isso: azóis, polienos, análogos de pirimidina e equinocandinas (DELAVY et al., 2019) e todos eles têm como alvo a membrana plasmática ou a parede celular (ODDS et al., 2003; SUNDRIYAL et al. 2006 e NGO et al., 2016).

Consequentemente, o sucesso do tratamento clínico depende, dentre outros fatores da resposta à terapia antifúngica. É descrito que cada *Candida* spp. apresenta diferentes perfis de suscetibilidade / resistência a antifúngicos (PAIS et al., 2019). Por exemplo, *C. glabrata* é mais resistente aos antifúngicos azólicos devido à superexpressão de transportadores de resistência a múltiplas drogas que são ativados pelo fator de transcrição Pdr1 (TSAI et al., 2006; CAUDLE et al., 2016 e WHALEY et al., 2016). *C. albicans* costuma ser mais suscetível ao tratamento com azol (CAVALHEIRO et al., 2017).

As infecções fúngicas invasivas causadas por *Candida* têm sido associadas a altos níveis de mortalidade (COSTA et al., 2016). O uso excessivo de drogas antifúngicas para tratamento e profilaxia tem sido associado a um rápido surgimento de patógenos fúngicos intrinsecamente resistentes. Isso representa uma preocupação, uma vez que os agentes antifúngicos disponíveis comercialmente são limitados conforme indicado

acima (COSTA et al., 2016). Além disso, *Candida* spp. tem alta capacidade de desenvolver rapidamente resistência a múltiplas drogas (VERMITSKY e EDLIND, 2004; SANGUINETTI et al., 2005 e REZAEI et al., 2009), tornando o tratamento clínico ainda mais complexo (DELAVY et al., 2019).

O mercado conta com poucas classes de medicamentos antifúngicos e todos eles são compostos químicos que têm os mesmos alvos, ou na membrana celular ou na parede celular dos fungos. Assim, observa-se que é altamente necessário o desenvolvimento de novos medicamentos antifúngicos aplicados no controle de infecções por *Candida*.

Produtos naturais tem sido uma fonte rica de compostos para a descoberta de drogas (EDRADA-EBEL et al., 2015). Historicamente, os produtos naturais oriundos de plantas e animais eram a fonte de praticamente todas as preparações medicinais e, mais recentemente, eles têm sido utilizados em ensaios clínicos particularmente como agentes antimicrobianos e antineoplásicos (EDRADA-EBEL et al., 2015). O avanço nos estudos e utilização desses produtos com atividade antimicrobiana tem aumentado consideravelmente devido aos diversos benefícios terapêuticos e baixos efeitos colaterais apresentados por eles. Com isso, eles têm sido estudados como fontes de novos agentes e condutores que podem contribuir para melhorar a atividade e diminuir a toxicidade do tratamento antifúngico (CRAGG e NEWMAN (2013); DE FREITAS e KAPLUM et al. 2018).

Compostos naturais oriundos de plantas exercem seus efeitos antifúngicos principalmente por mecanismo de ação na membrana, que globalmente inclui o mecanismo de polienos e azóis (BAMBA et al. 2017). A *Punica granatum*, cuja casca de sua fruta apresenta inúmeros fitoquímicos ricos em alcalóides e taninos incluindo punicalagina, granatinas A e B, casuarinina, pedunculagina, punigluconina, tellimagrandin I e corilagina (MOHANRAM et al. 2018), tem sido usada há séculos para tratar inúmeras doenças. Trabalho recente identificou que extratos etanólicos da casca de *P. granatum* apresentam boa atividade anti-*Candida*, principalmente contra as cepas resistentes ao fluconazol (MOHANRAM et al. 2018). Além disso, os efeitos antioxidantes (ROSENBLAT et al. 2004; VOLKOVA et al. 2008), anti-inflamatórios (DECORNEZ et al. 2004) e antimicrobianos da Romã (*Punica*

granatum) estimulam especialmente o uso desta planta também como alternativa para o tratamento da candidíase. Alcaloides, polifenóis, ácido elágico, ácido gálico e taninos como a punicalagina e punicalina estão entre os compostos bioativos relacionados à atividade antimicrobiana da romã (CORTEZ et al. 2010 e PEIXOTO et al. 2013), observou um efeito considerável do composto isolado punicalagina sobre *C. albicans* e *C. parapisilosis*, e (SAMPAIO et al. 2003) atribuíram aos taninos a capacidade de inibir o crescimento de leveduras de *Candida* devido sua ação na membrana celular levando a precipitação de proteínas (SCALBERT, 1991).

Da mesma forma que a romã, a própolis tem sido usada na medicina popular há séculos (DE CASTRO et al., 2013).Ela é uma mistura complexa de várias substâncias resinosas que são coletadas de plantas por abelhas (DE CASTRO et al., 2013). Sua composição química inclui mais de 300 compostos (BRUSCHI et al. 2000, SEIXAS et al. 2002 e GALINDO et al. 2008), entre eles flavonóides, terpenóides e fenilpropanóides (RODRIGUES et al. 2012).Tem sido relatado que flavonóides e compostos fenólicos são os principais responsáveis pelas atividades antibacterianas, antivirais e antifúngicas atribuídas aos extratos de própolis (VOLPI e BERGONZINI, 2006). Ainda, essas atividades têm sido atribuídas principalmente à flavolona pinocembrina, ao flavonol galagina, e ao éster feniletil do ácido caféico, que agem na inibição de RNA-polimerase bacteriana (SORKUN et al. 2005). Os flavonoides agiriam provavelmente na membrana ou parede celular levando a morte celular. (SCAZZOCHIO, D'AURIA et al. 2006). Além de a própolis apresentar baixa resistência antimicrobiana, trabalhos mostraram que mulheres que usaram topicamente uma solução de própolis a 5% melhoraram os resultados dos seus esfregaços vaginais e promoveram um bem-estar a estas pacientes uma vez que um alívio sintomático foi alcançado devido às propriedades anestésicas da própolis. (LIPOVAC et al. 2005; LIMA et al. 2012).

Por fim, o sisal (*Agave sisalana*) é uma planta monocotiledônea cultivada nas áreas semiáridas do Brasil de grande interesse econômico (MENDES et al., 2016), podendo das folhas se obter as fibras para produção de cadeiras, armários, reforço para materiais de construção e do resíduo produzir adubo

6- Conclusão

Os resultados obtidos indicam que a combinação entre os extratos de romã e sisal apresenta atividade sinérgica a qual foi demonstrada através de ensaios *in vitro* utilizando-se culturas de *C. albicans* de duas linhagens de referência distintas (ATCC10231 e SC5314). A combinação entre os extratos de romã, sisal e própolis, apesar do sinergismo antifúngico, não tem um efeito *in vitro* tão proeminente quanto a combinação dupla de sisal e romã. A análise química dos extratos glicólicos de própolis e romã através de CLAE demonstrou que os extratos utilizados para o desenvolvimento das formulações dos géis possuem os principais marcadores esperados para cada um desses extratos.

Assim, cria-se uma perspectiva promissora para o desenvolvimento de um produto comercial contendo extratos naturais e que apresentam atividade anti-candida e também com potencial para modular inflamação em processos infecciosos. Essas formulações apresentam um grande potencial de aplicação para o tratamento de candidíase tópica à baixo custo.

7- Referências

AF, A. A., Hammuel, C., Ezeayanaso, C., Ogabiela, E. E., Udiba, U. U., Anyim, B., & Olabanji, O. Preliminary phytochemical and antimicrobial screening of Agave sisalana Perrine juice (waste).

Almeida, E. C. D. S. L. (2013). Ação antifúngica do resíduo líquido integral e fracionado do desfibramento da folha do sisal (Agave sisalana) sobre Malassezia pachydermatis, Tricophyton mentagrophytes e Candida albicans.

Anibal, P. C., Peixoto, I. T. A., Foglio, M. A., & Höfling, J. F. (2013). Antifungal activity of the ethanolic extracts of Punica granatum L. and evaluation of the morphological and structural modifications of its compounds upon the cells of Candida spp. *Brazilian Journal of Microbiology*, *44*, 839-848.

Aviram, M., Rosenblat, M., Gaitini, D., Nitecki, S., Hoffman, A., Dornfeld, L. & Hayek, T. (2004). Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. *Clinical nutrition*, *23*(3), 423-433.

Aviram, M., Volkova, N., Coleman, R., Dreher, M., Reddy, M. K., Ferreira, D., & Rosenblat, M. (2008). Pomegranate phenolics from the peels, arils, and flowers are antiatherogenic: studies in vivo in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient (E0) mice and in vitro in cultured macrophages and lipoproteins. *Journal of agricultural and food chemistry*, *56*(3), 1148-1157.

Azie N, Neofytos D, Pfaller M, Meier-Kriesche H-U, Quan S-P, and Horn D. (2012). The PATH (Prospective Antifungal Therapy) Alliance® registry and invasive fungal infections: update 2012. *Diagn Microbiol Infect Dis* 73(4): 293–300. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.06.012

BARROS, Juliana Vieira de. **Investigação in vitro do potencial citotóxico e genotóxico do extrato da própolis vermelha do Estado de Pernambuco**. 2018. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

Bassiri-Jahromi, S., Pourshafie, M. R., Mirabzade Ardakani, E., Ehsani, A. H., Doostkam, A., Katirae, F., & Mostafavi, E. (2018). In vivo comparative evaluation of the pomegranate (Punica granatum) peel extract as an alternative agent to nystatin against oral candidiasis. *Iranian journal of medical sciences*, *43*(3), 296-304.

Berretta, A. A.; Marchetti, J. M. ; Ferreira, M. E. T. PATENTE: Gel termorreversível de liberação sustentada contendo Extrato Padronizado de Própolis (EPP-AF) e respectivo processo de fabricação, com atividade anti-séptica e cicatrizante para tratamento de queimaduras, lesões de pele e outros.. 2008

Bonassoli, L. A., Bertoli, M., & Svidzinski, T. I. E. (2005). High frequency of Candida parapsilosis on the hands of healthy hosts. *Journal of Hospital Infection*, *59*(2), 159-162.

Brown GD, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG, White TC. (2012). Hidden killers: human fungal infections*. Sci TranslMed*; 4:165rv13.

Caudle KE, Barker KS, Wiederhold NP, Xu L, Homayouni R, and Rogers PD (2011). Genomewide expression profile analysis of the *Candida glabrata* Pdr1 regulon. *Eukaryot Cell* 10(3): 373–83. doi: 10.1128/EC.00073-10

Cavalheiro M, Costa C, Pais P, and Teixeira MC. (2017). Acquition of Resistance to Azole Antifungal Drugs in *Candida* Species: Imidazoles versus Triazoles. In: Adv Med Biol, pp 183–210.

Chen C., Song X., Wei W., Zhong H., Dai J., Lan Z., Li F., Yu X., Feng Q., Wang Z., et al. (2017). The microbiota continuum along the female reproductive tract and its relation to uterine-related diseases*. Nat. Commun*.;8:875. doi: 10.1038/s41467-017-00901-0.

Conlon M & Bird A. (2015). The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health. *Nutrients7*, 17–44.

Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2013). Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, *1830*(6), 3670-3695.de Freitas, de Freitas, A. L. D.,
da Silva Carneiro, J., de Jesus Silva, M. C., dos Santos, E. N., Lima, F. L. O., & Costa, M. S. F. (2021). Atividades biológicas de Agave sisalana com ênfase para a ação antimicrobiana: uma revisão da literatura. *Research, Society and Development*, *10*(3), e2510312734-e2510312734.

Dalmagro, M., Donadel, G., Pinc, M. M., Stecanella, A. L., Tominc, G. C., Miranda, N., ... & Hoscheid, J. (2022). TESTE DE SINERGISMO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS DE Eugenia uniflora E

PRÓPOLIS POR MÉTODO DE CHECKERBOARD. *Revista Multidisciplinar em Saúde*, 1-8.

D'Auria FD, Tecca M, Scazzocchio F, Renzini V, Strippoli V. Effect of propolis on virulence factors of Candida albicans. J Chemother. 2003 Oct;15(5):454-60.

De Castro, P. A., Bom, V. L. P., Brown, N. A., de Almeida, R. S. C., Ramalho, L. N. Z., Savoldi, M., ... & Goldman, G. H. (2013). Identification of the cell targets important for propolis-induced cell death in Candida albicans. *Fungal Genetics and Biology*, *60*, 74-86.

Delavy, M., Dos Santos, A. R., Heiman, C. M., Coste, A. T. (2019). Investigating Antifungal Susceptibility in Candida Species With MALDI-TOF MS-Based Assays. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 9:19. doi: 10.3389/fcimb.2019.00019

Deo, P. N., & Deshmukh, R. (2019). Oral microbiome: Unveiling the fundamentals. *Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP*, *23*(1), 122.

Donlan RM. (2001). Biofilms and device-associated infections. *Emerg Infect Dis* 7:277–81. doi:10.3201/eid0702.010226

Edmond, M. B., Wallace, S. E., McClish, D. K., Pfaller, M. A., Jones, R. N., & Wenzel, R. P. (1999). Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clinical infectious diseases*, *29*(2), 239-244.

Eggimann P, Garbino J, Pittet D. (2003). Epidemiology of Candida species infections in critically ill nonimmunosuppressed patients. *Lancet Infect. Di*s. 3:685–702;

Endo, E. H., Cortez, D. A. G., Ueda-Nakamura, T., Nakamura, C. V., & Dias Filho, B. P. (2010). Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against Candida albicans. *Research in Microbiology*, *161*(7), 534-540.

Farkash, Y., Feldman, M., Ginsburg, I., Steinberg, D., & Shalish, M. (2019). Polyphenols inhibit Candida albicans and Streptococcus mutans biofilm formation. *Dentistry journal*, *7*(2), 42.

Fernandes, G. L. (2020). Extrato da casca de Punica granatum potencializa o efeito anti cárie de um enxaguatório bucal contendo trimetafosfato de sódio e flúor.

Franco, S. L., Bruschi, M. L., Moura, L. P. P., & Bueno, J. H. F. (2000). Avaliação farmacognóstica da própolis da região de Maringá. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, *9*, 1-10.

Gillum, A. M., Tsay, E. Y., & Kirsch, D. R. (1984). Isolation of the Candida albicans gene for orotidine-5′-phosphate decarboxylase by complementation of S. cerevisiae ura3 and E. coli pyrF mutations. *Molecular and General Genetics MGG*, *198*(1), 179-182.

Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, Vande Berg J, Hu J, et al. (2003). Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin. Infect. Dis*. 37:1172–77

Hallen-Adams et al., 2017 Hallen-Adams, H.E.; Suhr, M.J. (2017). Fungi in the healthy human gastrointestinal tract. *Virulence*; 8, 352–358.

Harvey, A. L., Edrada-Ebel, R., & Quinn, R. J. (2015). The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nature reviews drug discovery*, *14*(2), 111-129.

Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2004). Signaling to NF-κB. *Genes & development*, *18*(18), 2195-2224.

Höfling, J. F., Anibal, P. C., Obando-Pereda, G. A., Peixoto, I. A. T., Furletti, V. F., Foglio, M. A., & Gonçalves, R. B. (2010). Antimicrobial potential of some plant extracts against Candida species. *Brazilian Journal of Biology*, *70*, 1065-1068.

Huffnagle, G. B., & Noverr, M. C. (2013). The emerging world of the fungal microbiome. *Trends in microbiology*, *21*(7), 334-341.

Imhof, M., Lipovac, M., Kurz, C. H., Barta, J., Verhoeven, H. C., & Huber, J. C. (2005). Propolis solution for the treatment of chronic vaginitis. *International journal of gynecology & obstetrics*, *89*(2), 127-132.,

Kaplum, V., Rossi, D. C. P., da Silva, L. B. R., Melhem, M. D. S. C., Taborda, C. P., ... & Ishida, K. (2018). Proanthocyanidin polymeric tannins from Stryphnodendron adstringens are effective against Candida spp. isolates and for vaginal candidiasis treatment. *Journal of ethnopharmacology*, *216*, 184-190.

Kau AL, Ahern PP, Griffin NW, Goodman AL & Gordon JI. (2011). Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature* 474, 327–336.

Khatib R, Johnson LB, Fakih MG, Riederer K, and Briski L (2016). Current trends in candidemia and species distribution among adults: *Candida glabrata* surpasses *C. albicans* in diabetic patients and abdominal sources. *Mycoses* 59(12): 781–786. doi: 10.1111/myc.12531

Kitchen, D. B., Decornez, H., Furr, J. R., & Bajorath, J. (2004). Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature reviews Drug discovery*, *3*(11), 935-949.

Larrosa, M., González-Sarrías, A., Yáñez-Gascón, M. J., Selma, M. V., Azorín-Ortuño, M., Toti, S., ... & Espín, J. C. (2010). Anti-inflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A in a colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolic metabolism. *The Journal of nutritional biochemistry*, *21*(8), 717-725.

Luppens, S. B. I., Kara, D., Bandounas, L., Jonker, M. J., Wittink, F. R. A., Bruning, O., ... & Crielaard, W. (2008). Effect of Veillonella parvula on the antimicrobial resistance and gene expression of Streptococcus mutans grown in a dual-species biofilm. *Oral microbiology and immunology*, *23*(3), 183-189.

Lustosa, S. R., Galindo, A. B., Nunes, L. C., Randau, K. P., & Rolim Neto, P. J. (2008). Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, *18*, 447-454.M Cortez,

Madugula, P., Reddy, S., Koneru, J., Rao, A. S., Sruthi, R., & Dalli, D. T. (2017). “Rhetoric to Reality”-Efficacy of Punica Granatum Peel Extract on Oral Candidiasis: An In vitro Study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, *11*(1), ZC114.

Mansourian, A., Boojarpour, N., Ashnagar, S., Beitollahi, J. M., & Shamshiri, A. R. (2014). The comparative study of antifungal activity of Syzygium aromaticum, Punica granatum and nystatin on Candida albicans; an in vitro study. *Journal de mycologie médicale*, *24*(4), e163-e168.

Marim FM, Silveira TN, Lima DS, Jr., Zamboni DS. A method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells. PloS one. 2010;5:e15263.

Marim, F. M., Silveira, T. N., Lima Jr, D. S., & Zamboni, D. S. (2010). A method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells. *PloS one*, *5*(12), e15263.

Martin, A. R., Martins, M. A., Mattoso, L. H., & Silva, O. R. (2009). Caracterização química e estrutural de fibra de sisal da variedade Agave sisalana. *Polímeros*, *19*, 40-46.

Mendes, T. B., Oliveira, B. A., Silva, H. O., Santos, L., Souza, E. B., Silva, R. M. G., & Camargo, I. C. C. (2016). Toxicity of the extracts of sisal waste, obtained from decortications of the Agave sisalana. *Int J EnvironAgric Res*, *2*(6), 160-165.

Mengshol, J. A., Vincenti, M. P., & Brinckerhoff, C. E. (2001). IL-1 induces collagenase-3 (MMP-13) promoter activity in stably transfected chondrocytic cells: requirement for Runx-2 and activation by p38 MAPK and JNK pathways. *Nucleic acids research*, *29*(21), 4361-4372.

Ngo, H. X., Garneau-Tsodikova, S., and Green, K. D. (2016). A complex game of hide and seek: the search for new antifungals. *Medchemcomm* 7, 1285–1306. doi: 10.1039/C6MD00222F

Odds, F. C., Brown, A. J., and Gow, N. A. (2003). Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol*. 11, 272–279. doi: 10.1016/S0966-842X(03)00117-3

Ota, C., Unterkircher, C., Fantinato, V., & Shimizu, M. T. (2001). Antifungal activity of propolis on different species of Candida. *Mycoses*, *44*(9-10), 375-378.

Paul, S., Mohanram, K., & Kannan, I. (2018). Antifungal activity of curcumin-silver nanoparticles against fluconazole-resistant clinical isolates of Candida species. *Ayu*, *39*(3), 182.

Pereira, A. D. S., Seixas, F. R. M. S., & Aquino Neto, F. R. D. (2002). Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Química Nova*, *25*, 321-326.

Perlin, D. S. (2015). Echinocandin resistance in Candida. *Clinical Infectious Diseases*, *61*(suppl_6), S612-S617.

Rho J, Shin JH, Song JW, Park MR, Kee SJ, Jang SJ, et al. (2004). Molecular inves-tigation of two consecutive nosocomial clusters of *Candida tropicalis* candiduria using pulsed-field gel electrophoresis. *J Microbiol;* 42:80–6.

Rocha, Rodrigues et al. 2012

Sanguinetti, M., Posteraro, B., Fiori, B., Ranno, S., Torelli, R., & Fadda, G. (2005). Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of Candida glabrata collected during a hospital survey of antifungal resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *49*(2), 668-679.

Sanguinetti,M., Posteraro, B., and Lass-Flörl, C. (2015). Antifungal drug resistance among Candida species: mechanisms and clinical impact. Mycoses 58(Suppl 2), 2–13. doi: 10.1111/myc.12330

Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, *30*(12), 3875-3883.
Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, *30*(12), 3875-3883.
Scazzocchio, F., D'auria, F. D., Alessandrini, D., & Pantanella, F. (2006). Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiological research*, *161*(4), 327-333.

Sundriyal et al. 2006; Sundriyal, S., Sharma, R. K., and Jain, R. (2006). Current advances in antifungal targets and drug development. *Curr. Med. Chem*. 13, 1321–1335. doi: 10.2174/ 092986706776873023

Tsai H-F, Krol AA, Sarti KE, and Bennett JE. (2006). *Candida glabrata PDR1*, a transcriptional regulator of a pleiotropic drug resistance network, mediates azole resistance in clinical isolates and petite mutants. *Antimicrob Agents Chemother* 50(4): 1384–92. doi: 10.1128/AAC.50.4.1384-1392.2006

Tscherner M, Schwarzmüller T, Kuchler K. (2011). Pathogenesis and antifungal drug resistance of the human fungal pathogen *Candida glabrata*. *Pharmaceuticals* 4:169–86. doi:10.3390/ph4010169

Ujikawa, K., & Purchio, A. (1989). Substâncias antifúngicas, inibidoras de Aspergillus flavus e de outras espécies fúngicas, isoladas de Agave sisalana (sisal). *Ciênc. cult.(Säo Paulo)*, 1218-24.

Urizar, J. M. A. (2002). Candidiasis orales. *Rev Iberoam Micol*, *19*, 17-21.

Uzel, A., Sorkun, K., & Önça, Ö. (2005). D. Ço ulu, Ö. Gençay, and B. Sali h. *Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples*, 189-195.

Vermitsky, J. P., & Edlind, T. D. (2004). Azole resistance in Candida glabrata: coordinate upregulation of multidrug transporters and evidence for a

Pdr1-like transcription factor. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *48*(10), 3773-3781.

Vitale, R. F., & Ribeiro, F. D. A. Q. (2007). O papel do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF-alfa) no processo de erosão óssea presente no colesteatoma adquirido da orelha média. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, *73*, 123-127.

Volpi, N., & Bergonzini, G. (2006). Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC–electrospray mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *42*(3), 354-361.

Wey SB, Mori M, Pfaller MA, Woolson RF, Wenzel RP. (1988). Hospital-acquired candidemia. The attributable mortality and excess length of stay. *Arch. Intern. Med*. 148:2642– 45

Whaley SG, and Rogers PD. (2016). Azole Resistance in *Candida glabrata*. *Curr Infect Dis Rep* 18(12): 41. doi: 10.1007/s11908-016-0554-5

Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, and Edmond MB. (2004). Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 39(3): 309–17. doi: 10.1086/421946

Yapar N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. (2014). *Ther Clin Risk Manag.* 10:95–105. doi:10.2147/TCRM.S40160

Zaura E, Nicu EA, Krom BP, Keijser BJ. (2014). Acquiring and maintaining a normal oral microbiome: Current perspective. *Front Cell Infect Microbiol*.;4:85.

Zhao, Y., Jaber, V., & Lukiw, W. J. (2017). Secretory products of the human GI tract microbiome and their potential impact on Alzheimer's disease (AD): detection of lipopolysaccharide (LPS) in AD hippocampus. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *7*, 318.

Zida, A., Bamba, S., Yacouba, A., Ouedraogo-Traore, R., & Guiguemdé, R. T. (2017). Anti-Candida albicans natural products, sources of new antifungal drugs: A review. *Journal de mycologie medicale*, *27*(1), 1-19.