



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA TERAPÊUTICA E SEGURANÇA
TOXICOLÓGICA DO SISTEMA LIPÍDICO NANOESTRUTURADO CONTENDO 2-
HIDROXICHALCONA POR MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA O
TRATAMENTO DA CANDIDÍASE VULVOVAGINAL**

Lígia de Souza Fernandes

Orientadora: Profa. Dra. Maria Virginia Scarpa

Coorientadora: Profa. Dra. Ana Marisa Fusco-Almeida

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 DA EFICÁCIA TERAPÊUTICA E SEGURANÇA
TOXICOLÓGICA DO SISTEMA LIPÍDICO NANOESTRUTURADO CONTENDO 2-
HIDROXICALCONA POR MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA O
TRATAMENTO DA CANDIDÍASE VULVOVAGINAL**

Lígia de Souza Fernandes

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: Profa. Dra. Maria Virginia Scarpa

Coorientadora: Profa. Dra. Ana Marisa Fusco-Almeida

Araraquara (SP)

2022

F363a

Fernandes, Lígia de Souza.

Avaliação da eficácia terapêutica e segurança toxicológica do sistema lipídico nanoestruturado contendo 2-hidroxichalcona por métodos alternativos para o tratamento da candidíase vulvovaginal / Lígia de Souza Fernandes. – Araraquara: [S.n.], 2022.
139 f. : il.

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

Orientadora: Maria Virginia Scarpa.

Coorientadora: Ana Marisa Fusco-Almeida.

1. Candidíase vulvovaginal. 2. *Candida spp.* 3. Hidroxichalconas. 4. *Galleria mellonella*. 5. Carreadores lipídicos. 6. Segurança toxicológica. I. Scarpa, Maria Virginia, orient. II. Fusco-Almeida, Ana Marisa, coorient. III. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030078P6

Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Avaliação da eficácia terapêutica e segurança toxicológica do sistema lipídico nanoestruturado contendo 2-hidroxicalcona por métodos alternativos para o tratamento de candidíase vulvovaginal

AUTORA: LÍGIA DE SOUZA FERNANDES
ORIENTADORA: MARIA VIRGINIA COSTA SCARPA
COORIENTADORA: ANA MARISA FUSCO ALMEIDA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MARIA VIRGINIA COSTA SCARPA (Participação Virtual)
Departamento de Farmacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP Araraquara

Prof. Dr. ERYVALDO SÓCRATES TABOSA DO EGITO (Participação Virtual)
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Profa. Dra. JULIANA CAMPOS JUNQUEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal / Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos/UNESP

Prof. Dr. LUIS OCTÁVIO REGASINI (Participação Virtual)
Departamento de Química e Ciências Ambientais / Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas do Câmpus de São José do Rio Preto - Unesp

Profa. Dra. IOLANDA MIDEA CUCCOVIA (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica / Instituto de Química da Universidade de São Paulo

Araraquara, 14 de setembro de 2022

SUMÁRIO

RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABELAS.....	XVI
LISTA DE ABREVIACÕES.....	XVIII
1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	28
2.1 Candidíase vulvovaginal.....	29
2.2 Chalconas.....	32
2.3 Sistemas lipídicos	35
2.4 Métodos alternativos para avaliação da eficácia terapêutica e segurança toxicológica	35
2.4.1 <i>Galleria mellonella</i>	37
3 OBJETIVOS	40
3.1 Objetivo geral	41
3.2 Objetivos específicos.....	41
4 MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1 Obtenção das moléculas de 2-hidroxichalcona (2-HC) e 3'-hidroxichalcona (3'-HC).....	43
4.2 Prospecção da atividade antifúngica <i>in vitro</i> e citotoxicidade da 2-hidroxichalcona e 3'-hidroxichalcona	43
4.2.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	43
4.2.2 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)	44
4.2.3 Avaliação da citotoxicidade da 2-hidroxichalcona e 3'-hidroxichalcona em cultura celular monocamada.....	45
4.3 Prospecção da atividade antifúngica <i>in vitro</i> combinatória e citotoxicidade das combinações	46
4.3.1 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antifúngica combinatória.....	47
4.3.2 Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> das combinações.....	55
4.4 Desenvolvimento do sistema lipídico (SL)	55

4.5 Caracterização física do sistema lípico (SL)	56
4.5.1 Análise do perfil de textura	56
4.5.2 Determinação <i>in vitro</i> da força mucoadesiva	56
4.5.3 Determinação do trabalho de seringabilidade	57
4.6 Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de 2-hidroxichalcona no sistema lipídico (SL) por espectrofotometria no UV-Visível.....	57
4.6.1 Especificidade/Seletividade	58
4.6.2 Linearidade e faixa linear de trabalho	59
4.6.3 Precisão.....	59
4.6.4 Exatidão	59
4.6.5 Limite de detecção e limite quantificação	60
4.6.6 Robustez	61
4.7 Eficiência de encapsulamento	62
4.8 Ensaios <i>in vivo</i> com <i>Galleria mellonella</i>	63
4.8.1 Condições gerais.....	63
4.8.2 Avaliação da segurança toxicológica dos compostos bioativos sozinhos, associados e do sistema lipídico	63
4.8.3 Avaliação da eficácia terapêutica dos compostos bioativos sozinhos, associados e do sistema lipídico	64
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	65
5.1 Prospeção da atividade antifúngica <i>in vitro</i> e citotoxicidade da 2-hidroxichalcona e 3'-hidroxichalcona	66
5.1.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)	66
5.1.2 Avaliação da citotoxicidade da 2-hidroxichalcona e 3'-hidroxichalcona em cultura celular monocamada.....	69
5.2 Prospeção da atividade antifúngica <i>in vitro</i> combinatória e citotoxicidade das combinações	72

5.2.1 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antifúngica combinatória.....	72
5.2.2 Avaliação da citotoxicidade das combinações	94
5.3 Desenvolvimento do sistema lipídico (SL)	101
5.4 Caracterização física do sistema lipídico.....	103
5.4.1 Análise do perfil de textura	103
5.4.2 Determinação <i>in vitro</i> da força mucoadesiva	104
5.4.3 Determinação do trabalho de seringabilidade	105
5.5 Ensaios iniciais de desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação dos princípios ativos nas formulações por espectrofotometria no UV-Visível.....	105
5.5.1 Especificidade/seletividade	105
5.5.2 Linearidade	107
5.5.3 Precisão.....	112
5.5.4 Exatidão	114
5.5.5 Limite de detecção e quantificação	116
5.5.6 Robustez	117
5.5.7 Eficiência de encapsulamento	118
5.6 Ensaios <i>in vivo</i> com <i>Galleria mellonella</i>	118
5.6.1 Avaliação da segurança toxicológica e eficácia terapêutica dos compostos bioativos e suas associações e dos sistemas lipídicos	118
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	124
7 CONCLUSÕES.....	128
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	130

RESUMO

As chalconas são uma classe de princípios ativos naturais precursores da biossíntese dos flavonoides. Dentro desta classe de compostos, existe uma subclasse de derivados das chalconas denominadas hidroxichalconas e que apresentam diversas atividades farmacológicas, como por exemplo, atividade antimicrobiana. Sabe-se que a candidíase vulvovaginal (CVV) ainda é uma das doenças que apresenta alta incidência e representa um grande problema de saúde pública. Considerando que os tratamentos com antifúngicos disponíveis apresentam efeitos colaterais e que se nota o aumento da resistência fúngica a estes fármacos, faz-se necessária a pesquisa de novas moléculas antifúngicas. O aumento de casos de CVV causadas por espécies não-*albicans* (naturalmente mais resistentes aos fármacos) reforçam esta necessidade de novas abordagens terapêuticas. A utilização das hidroxichalconas para o tratamento da CVV causada pela *Candida albicans* e espécies não-*albicans* ainda é pouco explorado. Outra abordagem terapêutica muito interessante e vantajosa são as terapias combinadas que muitas vezes são capazes de ampliar o espectro de ação, reduzir doses e efeitos colaterais de fármacos já existentes e evitar o surgimento de cepas resistentes. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo propor uma nova abordagem terapêutica para o tratamento da CVV por meio da bioprospecção das atividades antifúngicas e toxicidade da 2-hidroxichalcona, 3'-hidroxichalcona, de suas associações com fármacos antifúngicos e associadas entre si, para incorporação em um carreador lipídico para aplicação intravaginal. Os resultados obtidos demonstraram atividade antifúngica da 2-hidroxichalcona e 3'-hidroxichalcona na faixa de 7,81 a 31,25 µg/mL, no entanto, estas moléculas apresentaram-se citotóxicas para a linhagem celular C33A em concentrações maiores que 9,3 µg/mL. Com o objetivo de reduzir a citotoxicidade e ampliar o espectro de ação, foi realizada a associação destas moléculas com fluconazol, clotrimazol e associadas entre si. Nos ensaios de atividade antifúngica combinatória foram observadas interações vantajosas como sinérgica e parcialmente sinérgica. Algumas destas interações não apresentaram citotoxicidade e com isso, foi possível encontrar combinações efetivas e não citotóxicas para incorporar em uma formulação. No desenvolvimento desta formulação, foram obtidos dois sistemas lipídicos (SL) para veiculação dos princípios ativos e que foram utilizados nos ensaios *in vivo*. Na avaliação da segurança toxicológica e eficácia terapêutica em *G. mellonella*, todas concentrações testadas e os dois SLs selecionados apresentaram ausência de toxicidade, exceto a maior concentração da combinação da 2-HC com fluconazol. Quanto a eficácia terapêutica, as duas concentrações testadas mostraram-se eficazes. Os SLs desenvolvidos apresentaram características mecânicas satisfatórias para aplicação intravaginal. O método analítico para quantificação da hidroxichalcona nos SLs foi considerado validado e os dois SLs selecionados foram capazes de incorporar altas porcentagens da 2-hidroxichalcona. De modo geral, os resultados obtidos foram satisfatórios e podem ser utilizados para propor uma nova possibilidade terapêutica para CVV.

Palavras-chave: Candidíase vulvovaginal, *Candida spp.*, hidroxichalconas, *Galleria mellonella*, carreadores lipídicos, segurança toxicológica.

ABSTRACT

Chalcones are a class of natural active ingredients that are precursors for the biosynthesis of flavonoids. Within this class of compounds, there is a subclass of derivatives of chalcones called hydroxychalcones, which have several pharmacological activities, such as antimicrobial activity. It is known that vulvovaginal candidiasis (VVC) is still one of the diseases with a high incidence and represents a major public health problem. Considering that the available antifungal treatments have side effects and that there is an increase in fungal resistance to these drugs, it is necessary to research new antifungal molecules. The increase in VVC cases caused by non-albicans species (naturally more resistant to drugs) reinforces this need for new therapeutic approaches. The use of hydroxychalcones for the treatment of VVC caused by *Candida albicans* and non-albicans species is still poorly explored. Another very interesting and advantageous therapeutic approach is the combination therapies that are often able to broaden the spectrum of action, reduce doses and side effects of existing drugs and prevent the emergence of resistant strains. Thus, this study aimed to propose a new therapeutic approach for the treatment of VVC through the bioprospecting of the antifungal activities and toxicity of 2-hydroxychalcone, 3'-hydroxychalcone, its associations with antifungal drugs and associated with each other, for incorporation in a lipid carrier for intravaginal application. The results obtained showed antifungal activity of 2-hydroxychalcone and 3'-hydroxychalcone in the range of 7.81 to 31.25 µg/mL, however, these molecules were cytotoxic to the C33A cell line at concentrations greater than 9.3 µg/mL. In order to reduce cytotoxicity and broaden the spectrum of action, these molecules were combined with fluconazole, clotrimazole and associated with each other. In the combinatorial antifungal activity assays, advantageous interactions such as synergistic and partially synergistic were observed. Some of these interactions did not show cytotoxicity and, therefore, it was possible to find effective and non-cytotoxic combinations to incorporate in a formulation. In the development of this formulation, two lipid systems (SL) were obtained for the delivery of active principles, and which were used in in vivo assays. In the evaluation of toxicological safety and therapeutic efficacy in *G. mellonella*, all concentrations tested, and the two selected SLs showed no toxicity, except for the highest concentration of the combination of 2-HC with fluconazole. As for therapeutic efficacy, the two concentrations tested proved to be effective. The developed SLs showed satisfactory mechanical characteristics for intravaginal application. The analytical method for quantifying hydroxychalcone in SLs was considered validated and the two selected SLs were able to incorporate high percentages of 2-hydroxychalcone. In general, the results obtained were satisfactory and can be used to propose a new therapeutic possibility for VVC.

Keywords: Candidiasis vulvovaginal, *Candida spp.*, hydroxychalcones, *Galleria mellonella*, lipid carriers, toxicological safety.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura das chalconas.....	33
Figura 2. Estrutura da 2-hidroxichalcona. Massa molecular: 224,26 g/mol.	34
Figura 3. Estrutura da 3'-hidroxichalcona. Massa molecular: 224,26 g/mol.	34
Figura 4. Esquema da microplaca de 96 poços com as concentrações finais de fluconazol em µg/mL (azul) e 2-HC em µg/mL (verde) em cada um dos poços. (A): Concentrações finais dos poços das microplacas nos ensaios com <i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i> . (B): Concentrações finais dos poços das microplacas nos ensaios com <i>C. krusei</i>	49
Figura 5. Esquema da microplaca de 96 poços com as concentrações finais de fluconazol em µg/mL (azul) e 3'-HC em µg/mL (verde) em cada um dos poços. (A): Concentrações finais dos poços das microplacas nos ensaios com <i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i> . (B): Concentrações finais dos poços das microplacas nos ensaios com <i>C. krusei</i>	50
Figura 6. Esquema da microplaca de 96 poços com as concentrações finais de clotrimazol em µg/mL (laranja) e 2-HC em µg/mL (verde) em cada um dos poços. (A): Concentrações finais dos poços das microplacas nos ensaios com <i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i> . (B): Concentrações finais dos poços das microplacas nos ensaios com <i>C. krusei</i>	51
Figura 7. Esquema da microplaca de 96 poços com as concentrações finais de clotrimazol em µg/mL (laranja) e 3'-HC em µg/mL (verde) em cada um dos poços. (A): Concentrações finais dos poços das microplacas nos ensaios com <i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i> . (B): Concentrações finais dos poços das microplacas nos ensaios com <i>C. krusei</i>	52
Figura 8. Esquema da microplaca de 96 poços com as concentrações finais de 3'-HC em µg/mL (azul) e 2-HC em µg/mL (laranja) em cada um dos poços para os ensaios conduzidos com <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> e <i>C. krusei</i>	53
Figura 9. Esquema da microplaca de 96 poços. Azul: poços com mais de 80% de inibição do crescimento fúngico. Rosa: poços com menos de 80% de inibição do crescimento fúngico...	54
Figura 10. Esquema da microplaca de 96 poços. Laranja: poços da interface de crescimento e não crescimento.	54
Figura 11. Representação gráfica das CIM e CFM em µg/mL para 2-HC e 3'-HC frente as espécies de <i>Candida sp.</i>	68
Figura 12. Resultado da viabilidade celular (%) em relação às concentrações de 2-hidroxichalcona em µg/mL. C33A: Linhagem celular (epitélio de carcinoma cervical uterino).	70

Figura 13. Resultado da viabilidade celular (%) em relação às concentrações de 3'-hidroxichalcona em µg/mL. C33A: Linhagem celular (epitélio de carcinoma cervical uterino).

..... 70

Figura 14. (A): Matriz de porcentagens de inibição do crescimento da *C. albicans* na combinação da 2-HC com fluconazol.  -Porcentagens de inibição abaixo de 80%.

 -Porcentagens de inibição acima de 80% (valores em negrito/média de três experimento).  -Concentração de fluconazol em µg/mL.  -Concentração da 2-HC em µg/mL..... 75

Figura 14. (B) Interface entre crescimento “desejável” (acima de 80%) e crescimento não desejável (abaixo de 80%) para *C. albicans* na combinação da 2-HC com fluconazol..... 75

Figura 15. (A): Matriz de porcentagens de inibição do crescimento da *C. albicans* na combinação da 2-HC com clotrimazol.  -Porcentagens de inibição abaixo de 80%.

 -Porcentagens de inibição acima de 80% (valores em negrito/média de três experimento).  -Concentração de clotrimazol µg/mL.  -Concentração da 2-HC em µg/mL..... 76

Figura 15. (B) Interface entre crescimento “desejável” (acima de 80%) e crescimento não desejável (abaixo de 80%) para *C. albicans* na combinação da 2-HC com clotrimazol..... 76

Figura 16. (A): Matriz de porcentagens de inibição do crescimento da *C. albicans* na combinação da 3'-HC com fluconazol.  -Porcentagens de inibição abaixo de 80%.

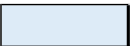
 -Porcentagens de inibição acima de 80% (valores em negrito/média de três experimento).  -Concentração de fluconazol em µg/mL.  -Concentração da 3'-HC em µg/mL. 77

Figura 16. (B) Interface entre crescimento “desejável” (acima de 80%) e crescimento não desejável (abaixo de 80%) para *C. albicans* na combinação da 3'-HC com fluconazol..... 77

Figura 17. (A): Matriz de porcentagens de inibição do crescimento da *C. albicans* na combinação da 3'-HC com clotrimazol.  -Porcentagens de inibição abaixo de 80%.

 -Porcentagens de inibição acima de 80% (valores em negrito/média de três

experimento).  -Concentração de clotrimazol em µg/mL.  -Concentração da 3'-HC em µg/mL.78

Figura 17. (B) Interface entre crescimento “desejável” (acima de 80%) e crescimento não desejável (abaixo de 80%) para *C. albicans* na combinação da 3'-HC com clotrimazol.....78

Figura 18. (A): Matriz de porcentagens de inibição do crescimento da *C. albicans* na combinação da 3'-HC com 2-HC.  -Porcentagens de inibição abaixo de 80%.

 -Porcentagens de inibição acima de 80% (valores em negrito/média de três experimento).  -Concentração da 3'-HC em µg/mL.  -Concentração da 2-HC em µg/mL.....79

Figura 18. (B) Interface entre crescimento “desejável” (acima de 80%) e crescimento não desejável (abaixo de 80%) para *C. albicans* na combinação da 3'-HC com 2-HC.....79

Figura 19. (A): Matriz de porcentagens de inibição do crescimento da *C. tropicalis* na combinação da 2-HC com fluconazol.  -Porcentagens de inibição abaixo de 80%.

 -Porcentagens de inibição acima de 80% (valores em negrito/média de três experimento).  -Concentração de fluconazol em em µg/mL.  -Concentração da 2-HC em µg/mL.....80

Figura 19. (B) Interface entre crescimento “desejável” (acima de 80%) e crescimento não desejável (abaixo de 80%) para *C. tropicalis* na combinação da 2-HC com fluconazol.....80

Figura 20. (A): Matriz de porcentagens de inibição do crescimento da *C. tropicalis* na combinação da 2-HC com clotrimazol.  -Porcentagens de inibição abaixo de 80%.

 -Porcentagens de inibição acima de 80% (valores em negrito/média de três experimento).  -Concentração do clotrimazol em µg/mL.  -Concentração da 2-HC em µg/mL.....81

Figura 20. (B) Interface entre crescimento “desejável” (acima de 80%) e crescimento não desejável (abaixo de 80%) para *C. tropicalis* na combinação da 2-HC com clotrimazol.....81

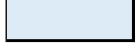
Figura 21. (A): Matriz de porcentagens de inibição do crescimento da <i>C. tropicalis</i> na combinação da 3'-HC com fluconazol.  -Porcentagens de inibição abaixo de 80%.  -Porcentagens de inibição acima de 80% (valores em negrito/média de três experimento).  -Concentração do fluconazol em µg/mL.  -Concentração da 3'-HC em µg/mL.	82
Figura 21. (B) Interface entre crescimento “desejável” (acima de 80%) e crescimento não desejável (abaixo de 80%) para <i>C. tropicalis</i> na combinação da 3'-HC com fluconazol.....	82
Figura 22. (A): Matriz de porcentagens de inibição do crescimento da <i>C. tropicalis</i> na combinação da 3'-HC com clotrimazol.  -Porcentagens de inibição abaixo de 80%.  -Porcentagens de inibição acima de 80% (valores em negrito/média de três experimento).  -Concentração do clotrimazol em µg/mL.  -Concentração da 3'-HC em µg/mL.....	83
Figura 22. (B) Interface entre crescimento “desejável” (acima de 80%) e crescimento não desejável (abaixo de 80%) para <i>C. tropicalis</i> na combinação da 3'-HC com clotrimazol.....	83
Figura 23. (A): Matriz de porcentagens de inibição do crescimento da <i>C. tropicalis</i> na combinação da 3'-HC com 2-HC.  -Porcentagens de inibição abaixo de 80%.  -Porcentagens de inibição acima de 80% (valores em negrito/média de três experimento).  -Concentração da 3'-HC em µg/mL.  -Concentração da 2-HC em µg/mL.....	84
Figura 23. (B) Interface entre crescimento “desejável” (acima de 80%) e crescimento não desejável (abaixo de 80%) para <i>C. tropicalis</i> na combinação da 3'-HC com 2-HC.....	84
Figura 24. (A): Matriz de porcentagens de inibição do crescimento da <i>C. krusei</i> na combinação da 2-HC com fluconazol.  -Porcentagens de inibição abaixo de 80%.  -Porcentagens de inibição acima de 80% (valores em negrito/média de três experimento).  -Concentração do fluconazol em µg/mL.  -Concentração da 2-HC em µg/mL.	85

Figura 24. (B) Interface entre crescimento “desejável” (acima de 80%) e crescimento não desejável (abaixo de 80%) para *C. krusei* na combinação da 2-HC com fluconazol.....85

Figura 25. (A): Matriz de porcentagens de inibição do crescimento da *C. krusei* na combinação da 2-HC com clotrimazol.  -Porcentagens de inibição abaixo de 80%.  - Porcentagens de inibição acima de 80% (valores em negrito/média de três experimento).  -Concentração do clotrimazol em µg/mL.  -Concentração da 2-HC em µg/mL.86

Figura 25. (B) Interface entre crescimento “desejável” (acima de 80%) e crescimento não desejável (abaixo de 80%) para *C. krusei* na combinação da 2-HC com clotrimazol.....86

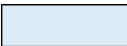
Figura 26. (A): Matriz de porcentagens de inibição do crescimento da *C. krusei* na combinação da 3'-HC com fluconazol.  -Porcentagens de inibição abaixo de 80%.  - Porcentagens de inibição acima de 80% (valores em negrito/média de três experimento).  -Concentração do fluconazol em µg/mL.  -Concentração da 3'-HC em µg/mL.87

Figura 26. (B) Interface entre crescimento “desejável” (acima de 80%) e crescimento não desejável (abaixo de 80%) para *C. krusei* na combinação da 3'-HC com fluconazol.....87

Figura 27. (A): Matriz de porcentagens de inibição do crescimento da *C. krusei* na combinação da 3'-HC com clotrimazol.  -Porcentagens de inibição abaixo de 80%.  - Porcentagens de inibição acima de 80% (valores em negrito/média de três experimento).  -Concentração do clotrimazol em µg/mL.  -Concentração da 3'-HC em µg/mL.88

Figura 27. (B) Interface entre crescimento “desejável” (acima de 80%) e crescimento não desejável (abaixo de 80%) para *C. krusei* na combinação da 3'-HC com clotrimazol.....88

Figura 28. (A): Matriz de porcentagens de inibição do crescimento da *C. krusei* na combinação da 3'-HC com 2-HC.  -Porcentagens de inibição abaixo de 80%.  - Porcentagens de inibição acima de 80% (valores em negrito/média de três experimento).

 -Concentração da 3'-HC em µg/mL.  -Concentração da 2-HC em µg/mL.

..... 89

Figura 28. (B) Interface entre crescimento “desejável” (acima de 80%) e crescimento não desejável (abaixo de 80%) para *C. krusei* na combinação da 3'-HC com 2-HC.....89

Figura 29. Resultados da citotoxicidade da combinação da 2-HC com fluconazol. Valores em negrito: porcentagem de viabilidade celular (dados normalizados). (Azul): concentrações de fluconazol em µg/mL. (Verde): concentrações de 2-HC em µg/mL.....95

Figura 30. Resultados da citotoxicidade da combinação da 2-HC com clotrimazol. Valores em negrito: porcentagem de viabilidade celular (dados normalizados). (Azul): concentrações de clotrimazol em µg/mL. (Verde): concentrações de 2-HC em µg/mL.....96

Figura 31. Resultados da citotoxicidade da combinação da 3'-HC com fluconazol. Valores em negrito: porcentagem de viabilidade celular (dados normalizados). (Azul): concentrações de fluconazol em µg/mL. (Verde): concentrações de 3'-HC em µg/mL.....97

Figura 32. Resultados da citotoxicidade da combinação da 3'-HC com clotrimazol. Valores em negrito: porcentagem de viabilidade celular (dados normalizados). (Azul): concentrações de clotrimazol em µg/mL. (Verde): concentrações de 3'-HC em µg/mL.98

Figura 33. Resultados da citotoxicidade da combinação da 3'-HC com 2-HC. Valores em negrito: porcentagem de viabilidade celular (dados normalizados). (Azul): concentrações de 3'-HC em µg/mL. (Verde): concentrações de 2-HC em µg/mL.99

Figura 34. Classificação visual dos sistemas obtidos: (A) – Sistema com baixa viscosidade e translúcido; (B) – Sistema com baixa viscosidade e opaco; (C) – Sistema com viscosidade média e translúcido; (D) – Sistema com viscosidade média e opaco; (E) – Sistema com alta viscosidade e translúcido; (F) – Sistema com alta viscosidade e opaco; (G) – Separação de fases. 101

Figura 35. Diagrama de fases pseudoternário constituído por óleo de rícino hidrogenado e fosfatidilcolina de soja (tensoativo/co-tensoativo – proporção 75:25, m/m), triglicerídeo cáprico/caprílico (fase oleosa) e água e regiões formadas. 102

Figura 36. Gráfico do trabalho da força mucoadesiva do SL (30, 35, 35): 30% de tensoativo/co-tensoativo (75:25, m/m), 35% fase oleosa e 35% de água e deste sistema contendo 0,1% de 2-HC e trabalho da força mucoadesiva do SL (30, 22, 48): 30% de tensoativo/co-tensoativo (75:25, m/m), 22% fase oleosa e 48% de água e deste sistema contendo 0,1% de 2-HC..... 104

Figura 37. (A) Espectro de absorção da 2-hidroxichalcona. (B) Espectro de absorção do sistema composto por 30% de tensoativo/co-tensoativo (75:25, m/m), 35% fase oleosa e 35% de água. (C) Espectro de absorção do sistema composto por 30% de tensoativo/co-tensoativo (75:25, m/m), 22% fase oleosa e 48% de água.	106
Figura 38. Absorbâncias em função das concentrações de 2-hidroxichalcona em etanol.....	107
Figura 39. Curva analítica (absorbâncias em função das concentrações de 2-hidroxichalcona em etanol); equação da reta e coeficiente de determinação.....	109
Figura 40. Gráfico de dispersão dos resíduos.....	110
Figura 41. Curva da analítica acrescida das concentrações diluídas a partir da solução de 2,0 µg/mL.	116
Figura 42. Curva de sobrevivência das larvas de <i>G. mellonella</i> após aplicação de diferentes concentrações da combinação da 2-HC com 3'-HC.....	119
Figura 43. Curva de sobrevivência das larvas de <i>G. mellonella</i> após aplicação de diferentes concentrações da combinação da 2-HC com FCZ.....	119
Figura 44. Curva de sobrevivência das larvas de <i>G. mellonella</i> após aplicação das hidroxichalconas sozinhas (nas concentrações correspondentes à CIM) e dos sistemas lipídicos desenvolvidos.	120
Figura 45. Curva de morbidade das larvas após administração de diferentes concentrações da combinação da 2-HC com 3'-HC durante 7 dias.....	120
Figura 46. Curva de morbidade das larvas após administração de diferentes concentrações da combinação da 2-HC com FCZ durante 7 dias.....	121
Figura 47. Curva de morbidade das larvas após administração dos princípios ativos individuais e dos sistemas lipídicos durante 7 dias.	121
Figura 48. Curva de sobrevivência das larvas de <i>G. mellonella</i> após inoculação de <i>C. albicans</i> e aplicação dos tratamentos.	122
Figura 49. Índice de saúde de cada grupo de larvas após o 2º, 4º e 6º dia após a infecção com <i>C. albicans</i> e aplicação dos tratamentos.....	123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros alterados para avaliação da robustez do método analítico. Letras maiúsculas: condições nominais das análises. Letras minúsculas: variações provocadas.	61
Tabela 2. Amostras preparadas combinando-se as condições nominais de análise e diferentes alterações no método analítico.	62
Tabela 3. Sistema de pontuação do índice de saúde.	64
Tabela 4. Resultados das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) e Concentrações Fungicidas Mínimas (CFM) em µg/mL.....	67
Tabela 5. Valores das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM ₈₀) em µg/mL, Concentração Efetiva 50% (CE ₅₀) em µg/mL e Índices de Seletividade (IS) da 2-hidroxichalcona e 3'-hidroxichalcona para a espécies <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> e <i>C. krusei</i>	71
Tabela 6. Resultados obtidos nos ensaios de avaliação da atividade in vitro combinatória para cada combinação testada, utilizando-se as espécies <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> e <i>C. krusei</i>	90
Tabela 7. Tipos de interações obtidas nos ensaios de atividade antifúngica combinatória nas diferentes combinações dos princípios ativos.	91
Tabela 8. Redução da CIM do fluconazol, clotrimazol, 2-HC e 3'-HC nas combinações para as espécies <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> e <i>C. krusei</i>	93
Tabela 9. Concentrações dos fármacos combinados (µg/mL) que apresentaram os menores ICIFs nos ensaios de atividade antifúngica combinatória, as interações e as porcentagens de viabilidade celular.....	100
Tabela 10. Propriedades mecânicas do SL (30, 35, 35): 30% de tensoativo/co-tensoativo (75:25, m/m), 35% fase oleosa e 35% de água e deste sistema contendo 0,1% de 2-HC. Propriedades mecânicas do SL (30, 22, 48): 30% de tensoativo/co-tensoativo (75:25, m/m), 22% fase oleosa e 48% de água e deste sistema contendo 0,1% de 2-HC.	103
Tabela 11. Trabalho de seringabilidade do SL (30, 35, 35): 30% de tensoativo/co-tensoativo (75:25, m/m), 35% fase oleosa e 35% de água e deste sistema contendo 0,1% de 2-HC e trabalho de seringabilidade do SL (30, 22, 48): 30% de tensoativo/co-tensoativo (75:25, m/m), 22% fase oleosa e 48% de água e deste sistema contendo 0,1% de 2-HC.	105
Tabela 12. Resultados do teste de estresse da 2-hidroxichalcona.	106
Tabela 13. Resultados da linearidade obtidos com as soluções de 2-hidroxichalcona em etanol.	107
Tabela 14. Variâncias de y (absorbâncias) para cada concentração.	108

Tabela 15. Resultados do teste de Cochran.	109
Tabela 16. Estatística de regressão.	109
Tabela 17. Resultados do teste de Shapiro-Wilk.	111
Tabela 18. Avaliação da significância do coeficiente angular (ANOVA). Nível de significância de 5%.	111
Tabela 19. Avaliação da significância do coeficiente linear (ANOVA).	112
Tabela 20. Resultados obtidos na avaliação da precisão por repetibilidade.	113
Tabela 21. Resultados obtidos na análise da precisão intermediária com soluções independentes de 2-hidroxichalcona em etanol, feitas em dias diferentes.	114
Tabela 22. Valores obtidos no ensaio de exatidão utilizando o sistema composto por 30% de tensoativo/co-tensoativo (75:25, m/m), 35% fase oleosa e 35% de água com 0,1% de 2-hidroxichalcona.	115
Tabela 23. Valores obtidos no ensaio de exatidão utilizando o sistema composto por 30% de tensoativo/co-tensoativo (75:25, m/m), 22% fase oleosa e 48% de água com 0,1% de 2-hidroxichalcona.	115
Tabela 24. Resultados obtidos nas condições nominais (amostra 1) e amostras com variações pré-determinadas.	117
Tabela 25. Grau de influência das variações.	117
Tabela 26. Eficiência de encapsulamento.	118
Tabela 27. Doses administradas nas larvas para avaliação da toxicidade in vivo (modelo <i>G. mellonella</i>).	119

LISTA DE ABREVIATURAS

2-HC – 2-Hidroxichalcona;
3'-HC – 3'-Hidroxichalcona;
AOAC – Association of Analytical Communities;
ASD – Ágar Sabouraud Dextrose;
ATCC – American Type Culture Collection;
BPL – Boas Práticas em Laboratórios;
BraCVAM – Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos;
CFM – Concentração Fungicida Mínima;
CI₅₀ – Concentração Inibitória 50%;
CIF – Concentração Inibitória Fracionada;
CIM – Concentração Inibitória Mínima;
CIM₈₀ – Concentração Inibitória Mínima 80%;
CLSI – Clinical & Laboratory Standards Institute;
CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal;
CTZ – Clotrimazol;
CVV – Candidíase vulvovaginal;
CVVR – Candidíase vulvovaginal recorrente;
DSMO – Dimetilsulfóxido;
ECVAM – European Centre for the Validation of Alternative Methods;
EDTA – Ethylenediamine tetraacetic acid;
FCZ – Fluconazol;
HBSS – Hanks' Balanced Salt Solution;
IC – Inclinação da curva analítica;
ICIF – Índice da Concentração Inibitória Fracionada;
INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde;
Inmetro – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia;
IS – Índice de Seletividade;
LD – Limite de detecção;
LNBio – Laboratório Nacional de Biociências;
LQ – Limite de quantificação;
MOPS – Ácido 3-[N-Morfolino] propanosulfônico;

OECD – Organization for Economic Co-operation and Development;
PBS – Phosphate-Buffered Saline;
RENAMA – Rede Nacional de Métodos Alternativos ao Uso de Animais;
SF – Separação de fases;
SLO – Sistema líquido opaco;
SLT – Sistema líquido transparente;
SL – Sistema lipídico;
SVO – Sistema viscoso opaco;
SVT – Sistema viscoso transparente;
TFS – Tampão Fosfato-Salino;
UFC – Unidades Formadoras de Colônia.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus, que permitiu que esta etapa se concretizasse. Em meio a tantos desafios o Senhor sempre mostrou sua presença em minha vida. Agradeço por caminhar comigo de mãos dadas e já agradeço aqui, pela família que me foi dada.

Obrigada pai e mãe por todo o apoio e paciência. Sei que não mediram esforços para me ajudar e me pouparam de muitas coisas para que eu pudesse me dedicar ao doutorado. Vocês são pais maravilhosos e meus melhores amigos! Amo vocês!

Agradeço ao meu irmão, que está longe na distância, mas muito perto no coração. Estou com saudades, meu irmão! Amo você!

Também agradeço a minha orientadora e grande amiga profa. Dra. Maria Virginia Scarpa. Obrigada pela amizade, carinho e por todo o apoio. Situações da vida me levaram até você e hoje, tenho certeza de que eu não poderia ter tido outra orientadora. Obrigada pela amizade, companheirismo e confiança! Amo você, minha querida e para sempre professora.

Agradeço imensamente a profa. Ana Marisa Fusco-Almeida que me acolheu em seu laboratório e me deu a possibilidade de adquirir muitos conhecimentos e ampliar a minha área de atuação. Obrigada professora, por me ajudar a concluir esta etapa tão importante para mim. Agradeço a todos os colegas de laboratório pelos conhecimentos compartilhados.

Agradeço também, do fundo do meu coração, aos alunos de Iniciação Científica que coorientei e aos que já coorientei e, aos alunos da graduação do curso de Farmácia. Apreendi muito com todos os alunos e sempre me senti realizada em passar meus conhecimentos. Apreendi nestes anos que ensinar é um ato de amor e engrandecimento mútuo!

Obrigada a Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP – Araraquara – SP) pela oportunidade de concluir mais esta etapa, tão desejada por mim!

Agradeço também aos docentes que participaram da comissão examinadora de qualificação e defesa pela contribuição no meu trabalho.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Candida* abrange cerca de 200 espécies, no entanto, somente algumas destas espécies são responsáveis pelas doenças fúngicas humanas. *Candida albicans* é a espécie predominante relacionada às patologias humanas e habita de forma comensal diversos nichos corporais, como boca e vagina. Apesar de compor a microbiota vaginal normal, quando ocorre alguma alteração no ambiente vaginal, esta levedura comensal oportunista, torna-se patogênica causando a candidíase vulvovaginal (CVV) (RODRIGUES et al., 2016; ARAÚJO; HENRIQUES; SILVA, 2017).

A candidíase vulvovaginal está relacionada com uma morbidade significativa afetando mulheres em todas as idades, por isso é considerada um grande problema de saúde pública. De acordo com dados epidemiológicos, cerca de 75% das mulheres já tiveram pelo menos um episódio de CVV durante a vida; em 50% dessas mulheres houve a ocorrência de outros episódios e de 5% a 10% das mulheres desenvolveram candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR), definida como quatro ou mais episódios de CVV em um ano. Considerando ainda os dados epidemiológicos, a CVVR afeta 138 milhões de mulheres em todo o mundo (GIRALDO et al., 1994; PATEL et al., 2004; SOBEL, 2007; POWELL & NYIRJESY, 2014; VRZAL; BITTNER; NEPERENY, 2015; SOBEL, 2015; MIRÓ et al., 2017).

De acordo com Lockhart (2014), a candidemia e a candidíase estão entre as mais frequentes infecções relacionadas à assistência de saúde, sendo responsável por uma significativa morbidade e mortalidade (GIRALDO et al., 1994; PATEL et al., 2004; SOBEL, 2007; POWELL & NYIRJESY, 2014; VRZAL; BITTNER; NEPERENY, 2015; SOBEL, 2015; MIRÓ et al., 2017).

A CVV afeta profundamente a qualidade de vida das mulheres infectadas. Dentre as infecções vulvovaginais, a CVV é a segunda mais frequente, representada por 17 a 39% dos casos, sendo que a espécie *Candida albicans* é responsável por 85 a 90% desses casos (LINHARES et al., 2005; BARBEDO et al., 2010; LOCKHART, 2014; SANGUINETTI, POSTERARO, LASS-FLORL, 2015; SOBEL, 2015; RODRIGUES et al., 2016; MANE et al., 2016; MIRÓ et al., 2017).

A espécie *Candida albicans* continua, até hoje, sendo o principal agente etiológico da CVV, no entanto, a CVV causada por espécies não-albicans tem aumentado significativamente. Considerando estas espécies não-albicans emergentes no Brasil, estão em destaque: *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*; *Candida parapsiloses*, *Candida dubliniensis* e *Candida guilliermondii*, responsáveis por 10% a 20% dos casos de CVV (FURLANETO-

MAIA et al., 2007; TOZZO & GRAZZIOTIN, 2012; VIERIA, 2016; GUNTHER et al., 2014; SOARES et al., 2018).

A resistência fúngica aos fármacos disponíveis é um problema que tem aumentado consideravelmente e que compromete a quimioterapia bem-sucedidas. *C. albicans* possui diversos mecanismos para defender-se do hospedeiro e as espécies não-*albicans* possuem menor susceptibilidade intrínseca aos antifúngicos. Além disso, o uso desenfreado de agentes antifúngicos, falta de diagnóstico e tratamentos incorretos, aumento do número de paciente imunocomprometidos e resistência fúngica cruzada, limitam ainda mais as possibilidades de tratamentos antifúngicos (SOBEL, 2015; MATHESON; MAZZA, 2017).

Quanto às terapias antifúngicas disponíveis atualmente, estas consistem em: creme vaginal com 1% de clotrimazol (uma vez ao dia durante 7 até 14 dias), creme vaginal com 2% de clotrimazol (uma vez ao dia durante 3 dias) e comprimidos vaginais nas doses de 500 mg (dose única) e 100 mg (1 comprimido durante 6 dias). Outros tratamentos comuns são: nistatina (dose de 100.000 UI, uma vez ao dia durante 14 dias), fluconazol (150 mg – dose única) e itraconazol (200 mg por dia durante 3 dias) (DANTAS LEAL et al., 2016). Em geral, é esperado uma resposta imediata na maioria dos pacientes frente ao tratamento realizado com estes antifúngicos, porém nos últimos anos esses tratamentos vêm apresentando ineficácia, devido à resistência fúngica.

Considerando não somente as infecções causadas pelas espécies de *Candida* assim como inúmeras outras patologias e a necessidade constante de novos medicamentos; diversos pesquisadores utilizam modelos animais convencionais para avaliar o potencial terapêutico de novas moléculas e/ou desenvolvem novos sistemas para incorporação de fármacos, totalizando em elevados números de animais utilizados em experimentos.

Com o objetivo de reduzir o uso de animais convencionais em experimentos, tanto por questões éticas quanto pelos custos gerados para manter estes animais em laboratório, podem ser utilizados modelos alternativos. Alguns exemplos de modelos experimentais alternativos são: modelos computacionais, uso de sistemas *in vitro*, uso de modelos animais em fases iniciais do desenvolvimento, uso de organismos invertebrados como *Galleria mellonella*, *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans* e uso de modelos animais que não sejam mamíferos como *Danio rerio* (zebrafish) entre outros (SCORZONI et al, 2015; SCORZONI et al., 2018; SINGULANI et al., 2018).

Os modelos alternativos de invertebrados são eticamente mais aceitos, possuem baixo custo de manutenção e possibilitam o estudo da interação patógeno-hospedeiro (GULLO, 2016).

Como forma de garantir o bem-estar dos animais e racionalizar seu uso em experimentos, foi criada a Lei Arouca (Lei 11794, de 2008), que trata da obrigatoriedade de usar recursos alternativos antes de realizar experiência em animais convencionais. A partir desta lei foi criado o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e tornou-se obrigatória a presença dos Comitês de Ética no Uso de Animais nas instituições de ensino ou pesquisa.

No Brasil, existe o Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM), responsável por validar e coordenar estudos de validação de métodos de substituição, redução ou refinamento referente ao uso de animais em experimentos e a Rede Nacional de Métodos Alternativos ao Uso de Animais (RENAMA).

A rede tem por objetivo (i) estimular a implantação de métodos alternativos ao uso de animais através do auxílio e do treinamento técnico nas metodologias necessárias; (ii) monitorar periodicamente o desempenho dos laboratórios associados através de comparações Interlaboratoriais; (iii) promover a qualidade dos ensaios através do desenvolvimento de materiais de referência químicos e biológicos certificados, quando aplicável; (iv) incentivar a implementação do sistema de qualidade laboratorial e dos princípios das boas práticas de laboratório (BPL); e (v) promover o desenvolvimento, a validação e a certificação de novos métodos alternativos ao uso de animais. Adicionalmente, há três laboratórios Centrais da RENAMA, o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro), responsável pela organização de comparações interlaboratoriais dentro da Rede, e contribuirá para a pesquisa, desenvolvimento e validação de novos métodos, o Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), organização social que opera sob contrato de gestão com o MCTIC e o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) que é o laboratório oficial do Ministério da Saúde para o controle da qualidade de produtos sujeitos à ação da Vigilância Sanitária.

Em 2014 o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) definiu dezessete métodos alternativos ao uso de animais para substituir, reduzir ou refinar o uso de animais em experimentação, estipulando o prazo de cinco anos para a adequação do cenário nacional a esta condição (RN nº 17, de 3 de julho de 2014 e RN nº 18, de 24 de setembro de 2014). Associada a estrutura da RENAMA, foi também criado o Centro Brasileiro de

Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM) para estudar os novos métodos ainda não validados. Em 2016, vinte e quatro métodos foram reconhecidos pelo CONCEA. Tais métodos, referem-se a Resolução Normativa N°18 de 24 de outubro de 2014 e a Resolução Normativa N° 31 de 18 de agosto de 2016.

Em 2019, entraram em vigor os 17 métodos contemplados na RN n.º 18 e, em 2021, passarão a vigorar os 7 métodos citados na RN n.º 31 de 18/08/2016.

Neste contexto, os métodos alternativos ao uso de animais convencionais, para ensaios de eficácia e segurança são de extrema importância para o setor produtivo, e neste caso, na área de avaliação da segurança de produtos derivados de fontes naturais por métodos alternativos à experimentação animal.

Assim, a parceria com o grupo do Núcleo de Proteômica, por meio do Laboratório de Métodos Alternativos de Bioprodutos, associado à RENAMA, se faz necessária para o desenvolvimento de novos produtos antifúngicos específicos na terapêutica da CVV.

Foram introduzidas metodologias *in vitro* e *in vivo* para avaliação de toxicidade utilizando cultivo celular em 2D e 3D de diversas linhagens celulares e modelos animais alternativos como Zebrafish (*Danio rerio*), *Galeria mellonella* e *Caenorhabditis elegans* pautando-se nos princípios da Toxicologia do Século XXI.

A utilização de novos princípios ativos naturais com potencial antifúngico são recursos importantes que podem ser utilizados para contornar diversas limitações das terapias antifúngicas existentes, no entanto, muitas destas moléculas possuem características lipofílicas levando a restrições farmacotécnicas e dificultando sua utilização clínica.

O emprego de sistemas lipídicos são excelentes caminhos para que estas moléculas bioativas possam ser utilizadas como novas abordagens terapêuticas. Com base nessas informações, o projeto propõe o uso da 2-hidroxicalcona veiculado em um carreador lipídico de aplicação intravaginal para o tratamento da CVV.

De acordo com a literatura, as chalconas são moléculas multifuncionais que apresentam amplo espectro farmacológico e grande potencial terapêutico (KIM; LEE; MOON, 2013; DÍAZ-TIELAS et al, 2016; EISSA; ELSHERBINY; MAGHMOMEH, 2017; PALANCO et al., 2017; ZHUANG et al., 2017; FERREIRA et al., 2018; ESCOBAR et al., 2019; UDDIN et al., 2020; MEDINA-ALARCÓN et al., 2020; NEVES et al., 2020; RAMMOHAN et al., 2020).

As hidroxichalconas são as principais substâncias da família das chalconas e também apresentam grande diversidade farmacológica, inclusive atividade antifúngica. São encontradas tanto na natureza como preparadas sinteticamente a partir de modificações na estrutura da

chalcona e que envolvem reações de síntese simples e de baixo custo. Existem alguns estudos na literatura que utilizam a 2-hidroxichalcona e 3'-hidroxichalcona, mas não há relatos de estudos para a utilização deste princípio ativo no tratamento da CVV (KIM; LEE; MOON, 2013; DÍAZ-TIELAS et al., 2016; EISSA; ELSHERBINY; MAGHMOMEH, 2017; PALANCO et al., 2017; ZHUANG et al., 2017; FERREIRA et al., 2018; ESCOBAR et al., 2019; UDDIN et al., 2020; MEDINA-ALARCÓN et al., 2020; NEVES et al., 2020; RAMMOHAN et al., 2020).

Sabe-se que os antifúngicos intramarginais tópicos são tão efetivos quanto os medicamentos administrados por via oral, possuem a vantagem de redução dos efeitos colaterais e maior rapidez no alívio dos sintomas quando comparados às formulações orais. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um sistema lipídico contendo 2-hidroxichalcona para aplicação intramarginal e tratamento da CVV e ainda, foi utilizado modelo animal alternativo aos mamíferos para avaliar a eficácia e segurança do sistema proposto, com o objetivo de reduzir o uso de animais convencionais e contribuir no desenvolvimento de novos métodos de avaliação da permeação e irritação dérmica. Adicionalmente, também foram realizados experimentos com 3'-hidroxichalcona, com a associação destas duas chalconas hidroxiladas e com as associações de cada uma delas com fluconazol e clotrimazol.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Candidíase vulvovaginal

Os nichos corporais são frequentemente habitados por um conjunto de microrganismos denominados microbiota e que estabelecem uma relação de benefícios mútuos com o organismo.

Candida albicans compõe a microbiota vaginal normal, no entanto, quando ocorre alguma alteração neste ambiente vaginal, a relação comensal pode tornar-se oportunista e patogênica, causando a candidíase vulvovaginal (CVV) (RODRIGUES et al., 2016; ARAÚJO; HENRIQUES; SILVA, 2017; RAO; MAHMOOD, 2019; CAMPOS et al., 2020; FARAHYAR et al., 2020; GUNDEL et al., 2020; KRISHNASAMY et al., 2020).

Candida albicans pertence ao genero *Candida*; este gênero abrange cerca de 200 espécies, mas dentre todas as espécies, *Candida albicans* é a mais frequente nas doenças fúngicas humanas. Dentre as infecções vulvovaginais, a CVV é a segunda mais frequente, representada por 17 a 39% dos casos, sendo que a espécie *Candida albicans* é responsável cerca de 90% desses casos (LINHARES et al., 2005; BARBEDO et al., 2010; LOCKHART, 2014; SANGUINETTI; POSTERARO; LASS-FLORL, 2015; SOBEL, 2015; RODRIGUES et al., 2016; MANE et al., 2016; MIRÓ et al., 2017; CAMPOS et al., 2020; GUNDEL et al., 2020; RAO; MAHMOOD, 2019).

A CVV é responsável por uma morbidade significativa e um grande problema de saúde e assistência pública. De acordo com dados epidemiológicos, a CVV afeta, pelo menos uma vez, a vida de 75% das mulheres; em 50% das mulheres houve a ocorrência de outros episódios e 5% a 10% são acometidas pela candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR), o que resulta em 138 milhões de mulheres afetadas pela CVVR em todo o mundo (GIRALDO et al., 1994; PATEL et al., 2004; SOBEL, 2007; POWELL & NYIRJESY, 2014; VRZAL; BITTNER; NEPERENY, 2015; SOBEL, 2015; SOBEL, 2015; MIRÓ et al., 2017; CAMPOS et al., 2020; GUNDEL et al., 2020; PANDIT, KEDAR, KOYATE, 2020).

Os encargos financeiros relacionados aos custos com diagnósticos, despesas com atestados médicos e tratamentos, geram um grande gasto anual que causam prejuízo às economias dos países. Segundo Giraldo et al., em 1994, o Brasil gastou cerca de 20 milhões de dólares por ano com custos para o tratamento da CVV, podendo chegar até 80 milhões de dólares por ano ao considerar os custos indiretos relacionados à CVV.

A CVV prejudica profundamente a qualidade de vida e o dia a dia das mulheres acometidas por esta infecção, comprometem a execução das atividades diárias e laborais e influenciam na autoestima. Tanto os sintomas quanto os agravos psicológicos e financeiros

levam a um estresse constante que acarretam a perda de produtividade, ausência no trabalho, gastos com consultas e tratamentos, depressão e sentimento de insatisfação (ABLLÉA et al., 2013; MIRÓ et al., 2017; FUKAZAWA, 2018; RAO; MAHMOOD, 2019; GUNDEL et al., 2020; CAMPOS et al., 2020).

Candida albicans possui alta capacidade de colonização e diversos mecanismos para defender-se do sistema imunológico do hospedeiro, assim, esta espécie pode causar desde infecções superficiais até infecções invasivas, atingindo mucosas, órgãos e ainda níveis sistêmicos (candidemia), o que pode levar a óbito. Estima-se que dentro de um grupo de um bilhão de pessoas, mais de 150 milhões apresenta graves doenças fúngicas; a mortalidade relacionada à essas doenças é similar à da tuberculose e três vezes maior do que a malária (BROWN et al., 2012; BONGOMIN et al., 2017; CAMPOS et al., 2020).

Dessa forma, *Candida albicans* possui relevante importância na prática clínica, devido ao elevado número de infecções causadas, devido às infecções severas e letais provocadas por esta espécie e por sua enorme capacidade de desenvolver resistência aos antifúngicos. No entanto, outras espécies do gênero *Candida* também têm chamado atenção dos pesquisadores devido ao aumento da frequência das infecções causadas por estas espécies não-*albicans*. Nota-se então, uma alteração do perfil etiológico da CVV, que varia de acordo com as diversas regiões do país, com as características dos grupos de indivíduos estudados e causas da infecção (PRASAD & KAPOOR, 2005; KIM et al., 2011; MORACE; PERDONI; BORCHI, 2014; WANG, Y. et al., 2015; WANG, B. et al., 2015; LIU et al., 2015; LO et al., 2015; RODRIGUES et al., 2016; ELFEKY et al., 2016; RAO; MAHMOOD, 2019; CAMPOS et al., 2020; CARBONE et al., 2020; FERRÃO et al., 2020; KRISHNASAMY et al., 2020).

Considerando as espécies não-*albicans* emergentes e causadoras da CVV em todo o Brasil, estão em destaque: *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*; *Candida parapsiloses*, *Candida dubliniensis* e *Candida guilliermondii*, responsáveis por 10% a 20% dos casos de CVV (FURLANETO-MAIA et al., 2007; TOZZO & GRAZZIOTIN, 2012; VIERIA, 2016; GUNTHER et al., 2014; SOARES et al., 2018; RAO; MAHMOOD, 2019; CAMPOS et al., 2020; FERRÃO et al., 2020; KRISHNASAMY et al., 2020).

A importância dos estudos dessas espécies está relacionada ao potencial de virulência e à capacidade desses microrganismos de desenvolver resistência aos antifúngicos; *Candida glabrata* e *Candida krusei*, por exemplo, possuem menor susceptibilidade intrínseca aos antifúngicos, principalmente aos azóis (CASTRO et al., 2006; HOLANDA et al., 2007; CORRÊA et al., 2009; DALAZEN et al., 2011; ELFEKY et al., 2016; BRANDOLT et al.,

2017; SAWANT & KHAN, 2017; DADAR et al., 2018; RAO; MAHMOOD, 2019; CAMPOS et al., 2020; FERRÃO et al., 2020; KRISHNASAMY et al., 2020).

O aumento da frequência de infecções causadas por estas espécies emergentes deve-se ao aumento de pacientes imunocomprometidos, novas práticas médicas e ao uso indiscriminado dos agentes antifúngicos; este último fator contribui para a seleção de espécies menos susceptíveis aos antifúngicos, o que limita ainda mais as possibilidades de terapias contra infecções fúngicas (CASTRO et al., 2006; HOLANDA et al., 2007; CORRÊA et al., 2009; ELFEKY et al., 2016; SAWANT & KHAN, 2017; DADAR et al., 2018; CAMPOS et al., 2020; FERRÃO et al., 2020)

A resistência fúngica aos fármacos disponíveis é um problema emergente e devido ao grande número de infecções causadas por *Candida albicans*, é preocupante a incidência de cepas resistentes desta espécie aos antifúngicos “azóis” e esta incidência tem aumentado consideravelmente, comprometendo os tratamentos já utilizados. O uso desenfreado de agentes antifúngicos é outro fator importante que contribui significativamente para o surgimento das cepas resistentes e para a seleção das espécies não-*albicans*. Outro fator a ser considerado, diz respeito à resistência cruzada; a similaridade das estruturas químicas dos fármacos pode causar este tipo de resistência entre os agentes antifúngicos, por exemplo, alguns estudos apontam que isolados clínicos de *Candida albicans* resistentes ao fluconazol também apresentam resistência ao itraconazol, o que limita ainda mais o arsenal terapêutico disponível (PRASAD & KAPOOR, 2005; SOBEL et al., 1998; LOCKHART, 2014; CARBONE et al., 2020; GUNDEL et al., 2020; PANDIT; KEDAR; KOYATE, 2020; FARAHYAR et al., 2020; KRISHNASAMY et al., 2020; CAMPOS et al., 2020; FERRÃO et al., 2020)

A resistência fúngica também está relacionada com a capacidade de adesão dos microrganismos às células hospedeiras. A aderência às células do hospedeiro é a etapa crucial para o estabelecimento das infecções e invasão tecidual. Os microrganismos podem aderir às células do epitélio da mucosa vaginal através de interações específicas entre a superfície celular do hospedeiro e a superfície do patógeno (CASTRO et al., 2006; ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007; CARDOSO, 2017).

Os agentes antifúngicos orais disponíveis no mercado são tóxicos, sendo geralmente associados a muitos efeitos colaterais significativos como nefrotoxicidade, leucopenia, hepatomegalia, letargia, ataxia, anemia, intolerância gastrointestinal, dor de cabeça entre outros, o que dificulta a adesão da paciente ao tratamento. Alguns desses antifúngicos também devem ser administrados por longos períodos e alguns apresentam interações medicamentosas

preocupantes com os fármacos utilizados em outras quimioterapias. Geralmente é esperado uma resposta imediata na maioria dos pacientes frente ao tratamento realizado com estes antifúngicos existentes, porém nos últimos anos, alguns tratamentos já se mostraram ineficazes devido à resistência microbiana (GUENNEC et al., 1995; SOBEL et al., 1998; RAJESHKUMAR & SUNDARARAMAN, 2012; CAMPOY & ADRIO, 2017; WHALEY et al., 2017; CAMPOS et al., 2020; CARBONE et al., 2020; PANDIT; KEDAR; KOYATE, 2020).

2.2 Chalconas

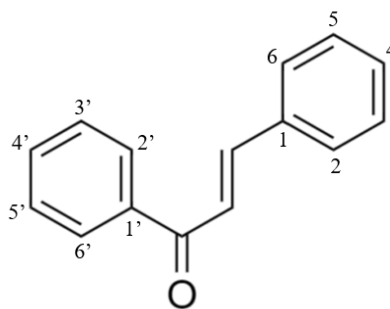
As chalconas compõe uma classe de compostos polifenólicos de origem vegetal e são precursores da biossíntese dos flavonoides. Esta classe de compostos pode ser encontrada no cerne, folhas, frutos e raízes de muitas plantas pertencentes à família das dicotiledôneas e em algumas monocotiledôneas, pteridófitos e gimnospermas. Nas famílias Asteraceae, Moraceae, Fabaceae e Aristolochiaceae, as chalconas são um dos principais compostos sintetizados pelas espécies (DÍAZ-TIELAS et al., 2016; SANTANA et al., 2015; FERREIRA et al., 2018).

As chalconas possuem coloração amarela e são responsáveis pela pigmentação das pétalas, são moléculas sinalizadoras nas simbioses planta-micróbio e possuem ação alelopática, ou seja, são essenciais na polinização e na sobrevivência das plantas (FERREIRA et al., 2018).

Estes compostos são sintetizados pela enzima chalcona sintase a partir de uma molécula de p-coumaril-CoA e três moléculas de malonil-CoA e são formados por dois anéis fenólicos ligados por uma ponte de 3 carbonos que contém uma ligação dupla α , β .

Sabe-se que a busca por compostos naturais com atividades farmacológicas é um importante caminho para a descoberta de novas moléculas com potencial farmacológico. De acordo com a literatura, as chalconas possuem ação: anti-inflamatória, antioxidante, anti-inflamatório, antileishmanial, antimalárico, antituberculose, antiviral, antibacterianos, anti-helmínticos, amebicidas, antiprotozoários, atividades antitumorais, atuam contra doenças do aparelho digestivo e doenças cardiovasculares, ou seja são moléculas multifuncionais que apresentam amplo espectro farmacológico e grande potencial terapêutico (KIM; LEE; MOON, 2013; SANTANA et al. 2015; EISSA; ELSHERBINY; MAGHMOMEH, 2017; PALANCO et al., 2017; FERREIRA et al., 2018; DE JESÚS ACOSTA-COTA et al., 2019, ESCOBAR et al., 2019; UDDIN et al., 2020).

A Figura 1 demonstra a estrutura básica das chalconas.

Figura 1. Estrutura das chalconas.

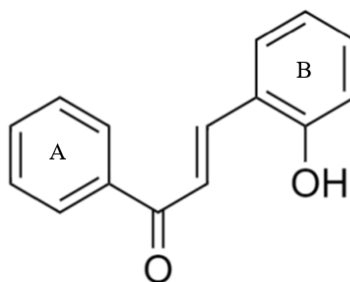
(Fonte: O autor)

Uma série de derivados das chalconas, encontrados tanto na natureza como preparados sinteticamente, também tem sido têm estudados e suas atividades farmacológicas tem sido utilizadas com a finalidade de propor novas abordagens terapêuticas para o tratamento de diversas patologias. Estes derivados muitas vezes apresentam vantagens pois ao modificar a estrutura da chalcona pode-se otimizar ou direcionar sua ação farmacológica, avaliar o efeito de diferentes grupos funcionais nas atividades biológicas, e ainda, obter compostos com menor toxicidade. Dessa forma, a estrutura química da chalcona pode ser utilizada como ponto de partida para sintetizar seus derivados, por meio de reações de hidroxilação, condensação ou metilação da molécula de chalcona (KIM; LEE; MOON, 2013; EISSA; ELSHERBINY; MAGHMOMEH, 2017; PALANCO et al., 2017; UDDIN et al., 2020).

As hidroxichalconas compõe a principal substância da família das chalconas e também apresentam grande diversidade farmacológica. Alguns exemplos dessa subclasse de compostos são: 2'-hidroxichalcona, 3'-hidroxichalcona e 2-hidroxichalcona (NOWAKOWSKA, 2007; SANTANA et al., 2015; MEDINA-ALARCÓN et al., 2020).

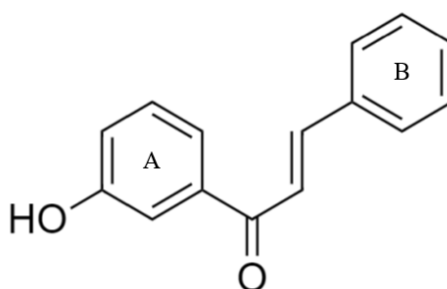
Dados da literatura demonstram a atividade antimicrobiana da 2'-hidroxichalcona e 3'-hidroxichalcona contra *Paracoccidioides spp* e *Cryptococcus gattii*, respectivamente. Outro derivado é a 2-hidroxichalcona; esta molécula possui uma hidroxila na posição 2 do anel aromático B, conforme mostra a Figura 2. A 3'-hidroxichalcona apresenta uma hidroxila na posição 3 do anel aromático A, conforme mostra a Figura 3.

Figura 2. Estrutura da 2-hidroxichalcona. Massa molecular: 224,26 g/mol.



(Fonte: O autor)

Figura 3. Estrutura da 3'-hidroxichalcona. Massa molecular: 224,26 g/mol.



(Fonte: O autor)

Sabe-se que a adição de grupos hidroxilas nas moléculas de chalconas podem aumentar suas atividades farmacológicas. Ferreira et al. (2018) mostrou em seu estudo, que a hidroxila presente no anel A da 2-hidroxichalcona contribuiu para atividade antioxidante e anti-inflamatória. Karthikeyan et al. (2015) demonstrou o aumento da atividade anticâncer e maior seletividade para as células tumorais das chalconas hidroxiladas.

Embora algumas atividades da 2-hidroxichalcona e 3'-hidroxichalcona já foram demonstradas, como: atividade anticâncer e hipoglicêmica, os estudos destes derivados para o tratamento da CVV são escassos (KIM; LEE; MOON, 2013; PALANCO, 2017; EISSA; ELSHERBINY; MAGHMOMEH, 2017; XIE et al., 2019; MEDINA-ALARCÓN et al., 2020).

A baixa solubilidade aquosa e a fotossensibilidade da 2-hidroxichalcona são fatores que limitam sua utilização e por isso, o uso de carreadores lipídicos como veículo destas moléculas podem ser vantajosos.

2.3 Sistemas lipídicos

Os sistemas lipídicos formados por uma fase aquosa, fase oleosa e um tensoativo associado à um co-tensoativo, geralmente são obtidos por meio da construção de um diagrama de fases pseudoternário como ferramenta (OLIVEIRA; SCARPA, 2001; OLIVEIRA; SCARPA; CERA, 2002; OLIVEIRA et al., 2004).

Esse diagrama é representado por um triângulo equilátero no qual cada vértice é um constituinte: fase aquosa, oleosa e tensoativo/co-tensoativo, sendo que este último é uma relação fixa de tensoativos formando um “pseudocomponente”. Quando diferentes proporções destas fases são misturadas, pode-se obter diferentes sistemas com diferentes graus de organização (OLIVEIRA; SCARPA, 2001; OLIVEIRA; SCARPA; CERA, 2002; OLIVEIRA et al., 2004).

O diagrama de fases consiste então em um método rápido, prático e eficiente para desenvolvimento racional de sistemas e permite visualizar diferentes regiões, o que torna fácil a escolha do sistema ideal. Com diagrama de fases é possível também obter sistemas mais estáveis e que possam promover a liberação controlada dos fármacos (OLIVEIRA; SCARPA, 2001; OLIVEIRA; SCARPA; CERA, 2002; OLIVEIRA et al., 2004).

Sabe-se que as propriedades físico-químicas dos fármacos são importantes para sua absorção e propriedades farmacocinéticas. A característica hidrofóbica de um princípio ativo promove seu acesso ao local de ação, no entanto, para solubilizar e veicular estas moléculas são necessários o uso de recursos farmacotécnicos, dessa forma, a absorção e permeação dos fármacos está intimamente relacionada com suas propriedades físico-químicas, com a formulação utilizada e com a via de administração do fármaco. A baixa solubilidade aquosa de muitos fármacos leva a restrições no seu uso clínico e os recursos farmacotécnicos são utilizados para contornar esta limitação. O uso de carreadores lipídicos são recursos importantes e podem ser usados como veículos transportadores, além disso, estes sistemas são capazes de aumentar a permeação de um fármaco, aumentar a estabilidade de fármacos, aumentar a biodisponibilidade e direcionar as moléculas para um sítio de ação específico, o que potencializa a atividade farmacológica (OLIVEIRA; SCARPA, 2001; OLIVEIRA; SCARPA; CERA, 2002; OLIVEIRA et al., 2004).

2.4 Métodos alternativos para avaliação da eficácia terapêutica e segurança toxicológica

Estima-se que 115 milhões de animais por ano são utilizados em experimentos no mundo todo. Ainda que muito utilizados, os animais convencionais aplicados em experimentos

apresentam limitações como: complexidade do organismo, dificuldades com alto custo, estudos em grande escala e ainda, são susceptíveis a diversos interferentes, como o estresse. Neste contexto, outros modelos mais simples e eticamente mais aceitos têm sido utilizados como alternativas ao uso dos animais convencionais.

Os ensaios pré-clínicos normalmente são realizados utilizando mamíferos como ratos, camundongos, cobaias e coelhos; o uso destes animais tem gerado polêmica tanto por questões éticas quanto por questionamentos envolvendo a real representatividade destes modelos. Diversos trabalhos relatam que estes animais convencionais, ratos, camundongos, cobaias e coelhos, não conseguem avaliar de fato, os possíveis efeitos causados em humanos. Além disso, estes animais quando submetidos à algum estresse podem desenvolver infecções, comprometendo os resultados dos experimentos. Outra desvantagem no uso destes modelos é que os experimentos tornam-se mais demorados e os custos para manter estes animais em laboratório são elevados, pois são necessárias salas climatizadas e outros cuidados (ARROWSMITH, 2012). William Russel e Rex Burch, em 1959, publicaram um livro chamado “Os princípios da técnica experimental humanitária” no qual apresentam o conceito dos 3Rs. Os 3Rs significam *Reduction*, *Replacement* e *Refinement* e abordam a otimização da quantidade de animais utilizados nos experimentos, a substituição desses animais, quando possível, e a “humanização” dos procedimentos experimentais. Dessa forma, diversos grupos de pesquisas buscam implementar os 3Rs em seus experimentos. O uso de modelos alternativos são recursos utilizados para aplicar os 3Rs e são ótimos modelos para avaliar toxicidade inicial de fármacos e realizar ensaios de triagem, a fim de reduzir os números dos animais convencionais utilizados. São exemplos de modelos experimentais alternativos: modelos computacionais, uso de sistemas *in vitro*, uso de modelos animais em fases iniciais do desenvolvimento, uso de organismos invertebrados como *Galleria Mellonella*, *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster*, uso de modelos animais que não sejam mamíferos como *Danio rerio* (zebrafish) entre outros. Os modelos alternativos de invertebrados são eticamente mais aceitos e possuem baixo custo de manutenção (GULLO, 2016).

Muitos dos modelos alternativos são capazes de reduzir o uso de animais convencionais e oferecem resultados confiáveis e reprodutíveis e por isso, observa-se a tendência na implantação destes modelos por parte das instituições.

Como forma de garantir o bem-estar dos animais foi criada a Lei Arouca (Lei 11794, de 2008) que trata da obrigatoriedade de usar recursos alternativos antes de realizar experiência em animais convencionais. A partir desta lei foi criado o Conselho Nacional de Controle de

Experimentação Animal (CONCEA) e tornou-se obrigatória a presença dos Comitês de Ética no Uso de Animais nas instituições de ensino ou pesquisa. No Brasil, também existem o Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM), responsável por validar e coordenar estudos de validação de métodos de substituição, redução ou refinamento referente ao uso de animais em experimentos e a Rede Nacional de Métodos Alternativos ao uso de animais (RENAMA). As farmacopeias e a OECD (Organization for Economic Co-operation and Development) fornecem guias mundiais para validação dos métodos alternativos.

2.4.1 *Galleria mellonella*

A *Galleria mellonella* é uma mariposa pertencente à ordem Lepidoptera e à família Pyralidae, é encontrada em diversas regiões do mundo como parasitas de colmeias e em 4 estágios de vida: ovo, larva, pupa e adultos (ROSSONI et al., 2019; VERTYPOROKH, WOJDA, 2020).

O início do ciclo de vida da *Galleria mellonella* dá-se com os ovos, depositados pelos adultos nas rachaduras das colmeias e possuem forma lisa, esférica e medem entre 0,4 e 0,5 mm. Após 5 a 8 dias, os ovos eclodem iniciando o estágio larval. As larvas possuem de 16 a 20 mm de comprimento, coloração branca ou acinzentada e alimentam-se principalmente de cera e pólen (ROSSONI et al., 2019; VERTYPOROKH; WOJDA, 2020).

Ao atingirem o final da fase larval, na qual a temperatura é o fator primordial para seu crescimento, a *G. mellonella* para de alimentar-se e produz uma seda que envolve seu corpo, formando o casulo e dando início ao estágio de pupa (ROSSONI et al., 2019; VERTYPOROKH; WOJDA, 2020).

As pupas possuem coloração inicial branca acastanhada, não se alimentam e permanecem imóveis nos casulos durante 1 a 9 semanas. Com o passar do tempo, as pupas adquirem coloração marrom escura e atingem a fase adulta (mariposas). Neste último estágio de vida, a *G. mellonella* é uma mariposa marrom com tamanho de 10 a 18 mm de comprimento. Dessa forma, seu ciclo de vida totaliza de 6 a 8 semanas (ROSSONI et al., 2019; VERTYPOROKH, WOJDA, 2020).

Os corpos das larvas são constituídos principalmente por uma camada de gordura na qual localiza-se o aparelho digestivo e seu corpo é dividido em cabeça, tórax e abdômen. Na parte anterior à cabeça localizam-se os olhos, antenas e boca, no tórax localizam-se seis pares de patas e no abdômen, um par de pró-patas (ROSSONI et al., 2019; VERTYPOROKH; WOJDA, 2020).

Estas larvas têm sido muito utilizadas como modelo animal alternativo aos mamíferos convencionais para pesquisas envolvendo ensaios toxicológicos, estudos de patogenicidade *in vivo* de bactérias e fungos e avaliação de novos compostos antimicrobianos (KEPPANAN et al., 2017; ALLEGRA et al., 2018; BARROS et al., 2019; CAMPOS-SILVA et al., 2019; MEYER et al., 2019; ROSSONI et al., 2019; VERTYPOROKH et al., 2019; CRESPO-ORTIZ; BURBANO; BARRETO, 2020; SARVARI; MIKANI; MOHAMEHRABADI, 2020; VERTYPOROKH; WOJDA, 2020).

Nos estudos de patogenicidade *in vivo*, as larvas são infectadas com os patógenos por via tópica, oral ou injetável e posteriormente recebem os tratamentos. A infecção por via tópica ocorre pela absorção dos patógenos pela cutícula; para infecção por via oral, os patógenos são misturados aos alimentos fornecido e na via injetável, os patógenos são injetados na última pró-pata com auxílio de uma seringa. A infecção pela via injetável é a mais comum pois dessa forma, é possível controlar a quantidade de patógenos injetados (KEPPANAN et al., 2017; BARROS et al., 2019; CAMPOS-SILVA et al., 2019; MEYER et al., 2019; ROSSONI et al., 2019; VERTYPOROKH et al., 2019; VERTYPOROKH; WOJDA, 2020).

Quanto ao sistema imunológico; os insetos não possuem imunidade adquirida, como os mamíferos, no entanto, a *Galleria mellonella* possui imunidade inata com diversos aspectos semelhantes aos mamíferos, o que a torna um excelente modelo alternativo de hospedeiro (BARROS et al., 2019; CAMPOS-SILVA et al., 2019; ROSSONI et al., 2019; VERTYPOROKH et al., 2019; SARVARI; MIKANI; MOHAMEHRABADI, 2020; VERTYPOROKH; WOJDA, 2020).

Nos mamíferos, a resposta imune inata é constituída por barreiras físicas, químicas e biológicas, proteínas séricas e células fagocíticas. A *G. mellonella*, também possui barreira física externa denomina cutícula, que é responsável por proteger a larva e é composta pela epicutícula, procutícula e epiderme. Quando um patógeno consegue atravessar esta cutícula, as larvas possuem um sistema imune responsável pela sua defesa.

A cavidade oral possui baixa umidade e pouca oferta de nutrientes e no intestino contém enzimas digestivas e flora intestinal que desfavorecem a infecção (ALLEGRA et al., 2018; BARROS et al., 2019; ROSSONI et al., 2019; SARVARI; MIKANI; MOHAMEHRABADI, 2020; VERTYPOROKH; WOJDA, 2020).

Na hemolinfa das larvas estão presentes os hemócitos, que são as células mais numerosas e mediadoras das defesas celulares, dessa forma, a hemolinfa assemelha-se ao sangue de mamíferos e os seus hemócitos são comparados aos macrófagos e neutrófilos dos mamíferos.

Os hemócitos também são responsáveis por mecanismos como: nodulação, encapsulação, melanização, produção de fenoloxidase, espécies reativas de oxigênio, coagulação da hemolinfa e produção de peptídeos antimicrobianos. Todas estas considerações levam à ampla utilização das larvas como modelo alternativo para estudos de patogenicidade *in vivo* (ALLEGRA et al., 2018; BARROS et al., 2019; ROSSONI et al., 2019; SARVARI; MIKANI; MOHAMEHRABADI, 2020; VERTYPOROKH; WOJDA, 2020).

Após a infecção das larvas com um determinado patógeno, é possível avaliar visualmente a sua saúde por meio quatro parâmetros principais: mobilidade, formação de casulos, melanização (aparência - manchas pretas na cutícula) e sobrevivência (morte – larvas negras). Além da avaliação visual, também é possível extrair a hemolinfa para a contagem de hemócitos, plaquear extratos larvais em placas de ágar para detectar a carga de patógenos e realizar cortes histológicos para análise dos patógenos retidos na gordura corporal e alterações das estruturas internas (ALLEGRA et al., 2018; BARROS et al., 2019; ROSSONI et al., 2019; SARVARI; MIKANI; MOHAMEHRABADI, 2020; VERTYPOROKH; WOJDA, 2020).

Diversos estudos mostram que os resultados obtidos com estes insetos apresentaram forte correlação com os resultados obtidos com ratos sendo que a utilizações da *G. mellonella* como modelo alternativo de infecção apresenta muitas vantagens como: baixos custos de manutenção no laboratório, sistema imune inato e suscetibilidade a diversos patógenos, modelo eticamente mais aceitos, ciclo de vida mais rápido ou seja, é um método de triagem rápida, não exige técnicas e equipamentos robustos, tempo de infecção letal é mais rápido que nos mamíferos (ALLEGRA et al., 2018; BARROS et al., 2019; ROSSONI et al., 2019; SARVARI; MIKANI; MOHAMEHRABADI, 2020).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a eficácia terapêutica e segurança toxicológica de um carreador lipídico contendo chalcona hidroxilada (2-hidroxichalcona ou 3'-hidroxichalcona) associadas com derivados azólicos ou associadas entre si utilizando modelos animais alternativos para o tratamento da candidíase vulvovaginal.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* da 2-hidroxichalcona e 3'-hidroxichalcona;
- Avaliar a atividade antifúngica combinatória *in vitro* da 2-hidroxichalcona e 3'-hidroxichalcona com fluconazol, clotrimazol e 2-hidroxichalcona com 3'-hidroxichalcona;
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* (cultura celular monocamada) da 2-hidroxichalcona, 3'-hidroxichalcona, das suas combinações com fluconazol e clotrimazol e da combinação das duas hidroxichalconas;
- Desenvolver e caracterizar um sistema lipídico para incorporação da combinação dos princípios ativos escolhidos;
- Desenvolver e validar um método analítico para quantificação da 2-hidroxichalcona no sistema lipídico;
- Avaliar a eficácia terapêutica e segurança toxicológica em larvas de *Galleria mellonella* do sistema lipídico contendo os princípios ativos selecionados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção das moléculas de 2-hidroxichalcona (2-HC) e 3'-hidroxichalcona (3'-HC)

As moléculas de 2-HC e 3'-HC foram sintetizadas no Laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos do Departamento de Química e Ciências Ambientais do IBILCE, Unesp São José do Rio Preto sob a coordenação do Prof. Dr. Luis Octávio Regasini e foram cedidas gentilmente por meio de colaboração para o Laboratório de Micologia e Núcleo de Proteômica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, para a execução deste trabalho.

4.2 Prospecção da atividade antifúngica *in vitro* e citotoxicidade da 2-hidroxichalcona e 3'-hidroxichalcona

Estes estudos foram conduzidos com o objetivo de se escolher a concentração mais efetiva contra as espécies de *Candida sp.* e com menor toxicidade para incorporação em uma formulação.

4.2.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Os ensaios foram realizados utilizando as cepas padrões de: *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Candida glabrata* ATCC 90030 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019. As leveduras foram reativadas e semeadas em placa de Petri contendo Ágar Sabouraud Dextrose (Acumedia Manufacturers, Michigan, USA).

As faixas de CIM para fluconazol e anfotericina B, consideradas como referências para o controle metodológico foram: 0,5 a 4,0 µg/mL e 0,25 a 2,0 µg/mL respectivamente e para *C. parapsilosis* (ATCC 22019). Para a *C. krusei* (ATCC 6258) as faixas de CIM para fluconazol e anfotericina B consideradas como referências foram de 6,4 a 64,0 µg/mL e 0,5 a 2,0 µg/mL, respectivamente (CLSI, 2008).

A susceptibilidade das cepas (na forma planctônica) à 2-HC e 3'-HC foram avaliadas conforme o procedimento descrito pelo CLSI M27A3 (2008), com modificações. Inicialmente foram preparadas soluções estoques de 2-HC e 3'-HC em DMSO a 4000,0 µg/mL. Para o ensaio, estas soluções foram diluídas em RPMI obtendo-se concentrações finais de 0,24 a 125,0 µg/mL.

Foram utilizados como controles positivos dez concentrações dos fármacos fluconazol (Sigma-Aldrich™, Saint Louis, USA) e anfotericina B (Sigma-Aldrich™, Saint Louis, USA), diluídos inicialmente em água e DMSO (Labsynth, Diadema, Brasil), respectivamente. Posteriormente, as soluções de fluconazol foram preparadas em meio RPMI nas concentrações de 0,125 a 64,0 µg/mL (para *C. krusei* o range foi de 0,25 a 128,0 µg/mL) e as soluções de anfotericina B, também foram preparadas em meio RPMI nas concentrações de 0,016 a 8,0

$\mu\text{g/mL}$. Também foi utilizado controle positivo para o crescimento fúngico (sem fármacos) e o controle negativo sem a presença dos fungos (somente o meio de cultura) (CLSI, 2008).

Para cada uma das espécies, foram coletadas colônias isoladas e transferidas para um tubo de ensaio contendo 5 mL de PBS (tampão salina fosfato). A densidade celular foi conferida por meio da contagem de células na câmara de Neubauer e posteriormente, o inóculo foi diluído em Caldo RPMI. A concentração final do inóculo foi de 10^4 UFC/mL (CLSI, 2008; ARAÚJO et al., 2013; FERNANDES et al., 2018).

Utilizando-se microplacas de 96 poços, foram adicionados em cada poço 100 μL de Caldo RPMI com L - glutamina, sem bicarbonato, com indicador vermelho de fenol, tampão MOPS [ácido 3-(N-morfolina) propanosulfônico], 2% de glicose e pH 7,0 (CLSI, 2008).

Nos poços da primeira coluna foram adicionados 200 μL das soluções de 2-HC, 3'-HC, fluconazol, clotrimazol e anfotericina B. A partir destes poços foram transferidos 100 μL para o segundo poço (contendo 100 μL de meio) e o volume final foi de 200 μL ; este mesmo procedimento foi feito para os poços subsequentes. Ao final da microdiluição, cada poço tinha um volume de 100 μL , então foram adicionados 100 μL do inóculo em cada poço assim, o volume final de cada poço foi de 200 μL e a concentração final do inóculo foi de $2,5 \times 10^3$ UFC/mL (CLSI, 2008; ARAÚJO et al., 2013; FERNANDES et al., 2018).

As microplacas foram incubadas à $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. Após este período foram adicionados 20 μL de resazurina (0,01%) e as microplacas foram incubadas novamente à $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 3 horas.

A concentração inibitória mínima foi considerada como a menor concentração do princípio ativo testado na qual não foi observado crescimento fúngico visual (CLSI, 2008; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012a). O crescimento fúngico foi evidenciado pela mudança da coloração da resazurina dessa forma, a CIM foi a menor concentração do agente testado na qual não foi observado mudança de coloração do meio (CLAUDINO et al., 2012; ARAÚJO et al., 2013; FERNANDES et al., 2018).

Os ensaios foram conduzidos em triplicata.

4.2.2 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)

A concentração fungicida mínima (CFM) foi determinada anteriormente à adição de resazurina nas microplacas utilizadas no ensaio de determinação da CIM. Dos poços nos quais não foram observados crescimento fúngico, foram retirados 10 μL das suspensões e inoculados em placas de Petri contendo o meio Ágar Sabouraud Dextrose (ASD). As placas foram

incubadas à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. A CFM foi considerada a menor concentração do agente testado na qual não houve crescimento de qualquer colônia de levedura no meio de cultura sólido.

4.2.3 Avaliação da citotoxicidade da 2-hidroxicalcona e 3'-hidroxicalcona em cultura celular monocamada

Para a avaliação da citotoxicidade das chalconas hidroxiladas, foi utilizada a linhagem C33A (epitélio de carcinoma cervical uterino) cultivadas em garrafas de poliestireno contendo meio de cultura RPMI (Sigma-Aldrich™, Saint Louis, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich™, Saint Louis, USA) e penicilina-estreptomicina (Invitrogen, California, USA) a 100 µg/mL. As células foram mantidas a 37°C e atmosfera úmida com 5% de CO_2 . O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas e para este ensaio foram utilizadas 3 passagens diferentes (OECD, 2010).

Ao atingirem confluência de 75%, as células presentes nas garrafas foram lavadas com solução tampão fosfato-salino (PBS). Para remoção das células aderidas ao poliestireno, adicionou-se solução aquosa de tripsina/EDTA a 0,25%. Posteriormente, foi adicionada a solução HBSS (solução balanceada de Hank) para neutralizar o efeito da tripsina/EDTA (OECD, 2010).

A solução HBSS contendo as células foi retirada das garrafas. Esta solução foi centrifugada a 1500 rpm por 5 minutos e então, o sobrenadante foi descartado. Após este procedimento, as células foram ressuspensas em RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino para contagem na câmara de Neubauer. Após a contagem das células na câmara de Neubauer foi utilizada a Equação 1 para determinar o número total de células no RPMI.

$$\text{Número total de células} = \frac{\text{Total de células contadas}}{4} \times 10000 \times \text{volume inicial} \times \text{fator de diluição} \quad \text{Equação 1}$$

As células foram cultivadas por 24 horas em meio RPMI com soro fetal bovino (10%) nas microplacas de 96 poços, de forma que cada poço tivesse 5×10^4 células (OECD, 2010). Após este período os conteúdos dos poços foram retirados e foram adicionados 100 µL de RPMI em cada poço.

Inicialmente, a 2-HC e 3'-HC foram solubilizadas em DMSO obtendo-se soluções com concentrações finais de 7500,0 µg/mL. Para o ensaio de citotoxicidade, estas soluções foram

diluídas em RPMI na concentração de 75,0 µg/mL. Neste ensaio, a faixa de concentração de 2-HC e 3'-HC utilizadas foram de 0,13 a 75,0 µg/mL.

Nos poços da coluna 1 das microplacas contendo as células cultivadas, foram adicionados 200 µL de 2-HC ou 3'-HC e então, foi realizada a microdiluição transferindo-se 100 µL de um poço para o outro.

Neste ensaio também foram utilizados um controle positivo contendo células com meio de cultura (células 100% viáveis) e um controle negativo contendo células mais 40% de DMSO e 60% de meio de cultura, para indução da morte celular.

As microplacas foram incubadas a 37°C e atmosfera úmida com 5% de CO₂. Após 72 horas o conteúdo de cada poço foi retirado com o auxílio de uma pipeta. Posteriormente, os poços foram lavados com PBS e foi adicionado em cada poço 100 µL de resazurina (50 µM em HBSS). As microplacas foram incubadas novamente a 37°C e atmosfera úmida com 5% de CO₂ por 1 hora e 30 minutos. Posteriormente, determinou-se a porcentagem de células viáveis utilizando-se leitora de microplacas a 580 nm – 590 nm.

O tempo de tratamento de 72 horas foi escolhido para que fosse possível determinar a viabilidade das células após a exposição aos princípios ativos por um período maior.

A porcentagem de viabilidade celular em cada poço foi calculada conforme a Equação 2.

$$\% \text{ de viabilidade celular} = \frac{(\text{ABS do poço} - \text{ABS do meio de cultura}) \times 100}{\text{Média das ABS controle de células viáveis} - \text{ABS do meio de cultura}} \quad \text{Equação 2}$$

Após os cálculos das porcentagens da viabilidade celular, foi utilizado o software GraphPad Prism 9.3.1 para o tratamento estatístico dos resultados obtidos e cálculo da CE₅₀ (Concentração Efetiva 50%). Os valores da CE₅₀ foram calculados utilizando-se curvas de dose-resposta feitas neste software e o Índice de Seletividade foi calculado conforme a Equação 3.

$$\text{IS} = \text{Concentração Efetiva 50\% (CE}_{50}) / \text{Concentração inibitória mínima (CIM}_{80}) \quad \text{Equação 3}$$

4.3 Prospecção da atividade antifúngica *in vitro* combinatória e citotoxicidade das combinações

Os ensaios de avaliação da atividade antifúngica *in vitro* e citotoxicidade *in vitro* também foram conduzidos combinando-se 2-HC e 3'-HC com fluconazol (Sigma-Aldrich™,

Saint Louis, USA), clotrimazol (Sigma-Aldrich™, Saint Louis, USA) e combinando-se 2-HC com 3'-HC.

4.3.1 Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica combinatória

A avaliação da atividade antifúngica combinatória foi realizada utilizando-se as cepas *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida tropicalis* ATCC 750 e *Candida krusei* ATCC 6258.

Para este ensaio, foi utilizado o método do “tabuleiro de xadrez”, conforme proposto por BELLIO et al. (2021). Este método consiste em combinar diferentes concentrações de dois princípios ativos utilizando-se microplacas de 96 poço.

Inicialmente foram preparadas soluções estoques de fluconazol em água e 2-HC, 3'-HC e clotrimazol, em DMSO (CLSI, 2008 com adaptações). Para a *C. albicans* e *C. tropicalis*, esta solução estoque de fluconazol foi diluída em meio RPMI nas concentrações de 16,0 e 32,0 µg/mL e a solução estoque de clotrimazol foi diluída em RPMI nas concentrações de 0,5 µg/mL e 1,0 µg/mL. A solução estoque de 2-HC foi diluída em meio RPMI na concentração de 250,0 µg/mL e a solução estoque de 3'-HC também foi diluída em RPMI nas concentrações de 125,0 µg/mL e 250,0 µg/mL.

Nas microplacas de 96 poços, foram adicionados em cada poço 100 µL de Caldo RPMI com L - glutamina, sem bicarbonato, com indicador vermelho de fenol, tampão MOPS ácido 3-[N-morfolina] propanosulfônico, 2% de glicose e pH 7,0 (CLSI, 2008).

Na linha A e colunas de 1 a 11 foram adicionados 100 µL da solução de fluconazol em RPMI a 16,0 µg/mL ou de clotrimazol em RPMI a 0,5 µg/mL. Na linha A e coluna 12 foram adicionados 100 µL da solução de fluconazol a 32,0 µg/mL ou de clotrimazol em RPMI a 1,0 µg/mL. Após a adição destas soluções, foi realizada a primeira microdiluição, da linha A até G (microdiluição no sentido vertical) transferindo-se 100 µL de um poço para o outro.

Posteriormente, foram adicionados nos poços da coluna 12, 100 µL da solução de 2-HC em RPMI a 125,0 µg/mL ou da solução de 3'-HC em RPMI a 125,0 µg/mL e então, foi realizada a segunda microdiluição, da coluna 12 até a coluna 2 (sentido horizontal) transferindo-se 100 µL de um poço para o outro.

Para os ensaios nos quais foram combinadas a 2-HC com 3'-HC, foram adicionados 100 µL da solução de 3'-HC a 125,0 µg/mL nos poços da linha A e colunas 1 a 11 e no poço da coluna 12, foi adicionada a solução de 3'-HC a 250,0 µg/mL e então, realizou-se a primeira microdiluição. Após este procedimento, foram adicionados 100 µL da solução de 2-HC a 125,0 µg/mL nos poços da coluna 12 e então, foi realizada a segunda microdiluição.

Nos ensaios com a *C. krusei*, foi realizado o mesmo procedimento, no entanto, a solução de fluconazol foi diluída em meio RPMI nas concentrações de 128,0 e 256,0 µg/mL e a solução estoque de clotrimazol foi diluída em RPMI nas concentrações de 2,0 µg/mL e 4,0 µg/mL.

Ao final das microdiluições, cada poço tinha um volume de 100 µL com diferentes concentrações dos princípios ativos combinados, porém nos poços das colunas 1 (linhas A a G) e linha H (colunas 2 a 12) continham cada um dos princípios ativos sozinhos.

Os inóculos foram preparados conforme descrito no item 4.2.1 e CLSI (2008) e após o preparo, foram adicionados 100 µL dos inóculos em cada poço. O volume final de cada poço foi de 200 µL e a concentração final do inóculo foi de $2,5 \times 10^3$ UFC/mL (CLSI, 2008; ARAÚJO et al., 2013; FERNANDES et al., 2018).

Foram feitos também controle positivo (controle do crescimento fúngico) e controle negativo (somente meio de cultura). Os ensaios foram conduzidos em triplicata.

As Figuras 4, 5, 6, 7 e 8 mostram os esquemas das microplacas de 96 poços com as concentrações finais dos princípios ativos combinados após a adição do inóculo, tanto para o ensaio conduzido com *C. albicans* e *C. tropicalis* quanto para os ensaios conduzidos com a *C. krusei*.

Figura 4. Esquema da microplaca de 96 poços com as concentrações finais de fluconazol em µg/mL (azul) e 2-HC em µg/mL (verde) em cada um dos poços. (A): Concentrações finais dos poços das microplacas nos ensaios com *C. albicans* e *C. tropicalis*. (B): Concentrações finais dos poços das microplacas nos ensaios com *C. krusei*.

(A): *C. albicans* e *C. tropicalis*.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Fluconazol (µg/mL)	A	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
			0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
	B	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
			0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
	C	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
			0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
	D	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
			0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
	E	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
			0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
	F	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
			0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
	G	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063
			0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
	H		0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
2-hidroxichalcona (µg/mL)													

(B): *C. krusei*.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Fluconazol (µg/mL)	A	32,0	32,0	32,0	32,0	32,0	32,0	32,0	32,0	32,0	32,0	32,0	32,0
			0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
	B	16,0	16,0	16,0	16,0	16,0	16,0	16,0	16,0	16,0	16,0	16,0	16,0
			0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
	C	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0
			0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
	D	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
			0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
	E	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
			0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
	F	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
			0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
	G	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
			0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
	H		0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
2-hidroxichalcona (µg/mL)													

Figura 5. Esquema da microplaca de 96 poços com as concentrações finais de fluconazol em µg/mL (azul) e 3’-HC em µg/mL (verde) em cada um dos poços. (A): Concentrações finais dos poços das microplacas nos ensaios com *C. albicans* e *C. tropicalis*. (B): Concentrações finais dos poços das microplacas nos ensaios com *C. krusei*.

(A): *C. albicans* e *C. tropicalis*.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Fluconazol (µg/mL)	A	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
			0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
	B	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
			0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
	C	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
			0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
	D	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
			0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
	E	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
			0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
	F	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
			0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
	G	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063
			0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
	H		0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
3’-hidroxichalcona (µg/mL)													

(B): *C. krusei*.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Fluconazol (µg/mL)	A	32,0	32,0	32,0	32,0	32,0	32,0	32,0	32,0	32,0	32,0	32,0	32,0
			0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
	B	16,0	16,0	16,0	16,0	16,0	16,0	16,0	16,0	16,0	16,0	16,0	16,0
			0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
	C	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0
			0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
	D	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
			0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
	E	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
			0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
	F	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
			0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
	G	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
			0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
	H		0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
3’-hidroxichalcona (µg/mL)													

Figura 6. Esquema da microplaca de 96 poços com as concentrações finais de clotrimazol em µg/mL (laranja) e 2-HC em µg/mL (verde) em cada um dos poços. (A): Concentrações finais dos poços das microplacas nos ensaios com *C. albicans* e *C. tropicalis*. (B): Concentrações finais dos poços das microplacas nos ensaios com *C. krusei*.

(A): *C. albicans* e *C. tropicalis*.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Clotrimazol (µg/mL)	A	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
			0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
	B	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063
			0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
	C	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031
			0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
	D	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016
			0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
	E	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008
			0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
	F	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004
			0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
	G	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002
			0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
	H		0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
2-hidroxichalcona (µg/mL)													

(B): *C. krusei*.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Clotrimazol (µg/mL)	A	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
			0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
	B	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
			0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
	C	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
			0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
	D	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063
			0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
	E	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031
			0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
	F	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016
			0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
	G	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008
			0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
	H		0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
2-hidroxichalcona (µg/mL)													

Figura 7. Esquema da microplaca de 96 poços com as concentrações finais de clotrimazol em µg/mL (laranja) e 3'-HC em µg/mL (verde) em cada um dos poços. (A): Concentrações finais dos poços das microplacas nos ensaios com *C. albicans* e *C. tropicalis*. (B): Concentrações finais dos poços das microplacas nos ensaios com *C. krusei*.

(A): *C. albicans* e *C. tropicalis*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
		0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
B	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063
		0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
C	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031
		0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
D	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016
		0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
E	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008
		0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
F	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004
		0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
G	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002
		0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
H		0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5

(B): *C. krusei*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
		0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
B	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
		0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
C	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
		0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
D	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063
		0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
E	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031
		0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
F	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016
		0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
G	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008
		0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
H		0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5

Figura 8. Esquema da microplaca de 96 poços com as concentrações finais de 3'-HC em µg/mL (azul) e 2-HC em µg/mL (laranja) em cada um dos poços para os ensaios conduzidos com *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*.

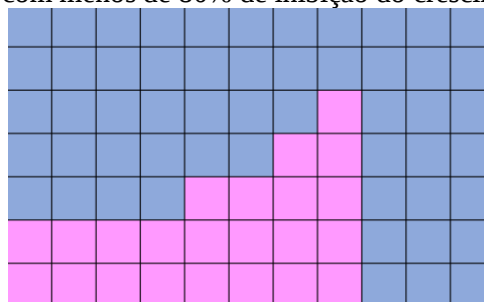
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25
		0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
B	15,625	15,625	15,625	15,625	15,625	15,625	15,625	15,625	15,625	15,625	15,625	15,625
		0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
C	7,813	7,813	7,813	7,813	7,813	7,813	7,813	7,813	7,813	7,813	7,813	7,813
		0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
D	3,906	3,906	3,906	3,906	3,906	3,906	3,906	3,906	3,906	3,906	3,906	3,906
		0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
E	1,953	1,953	1,953	1,953	1,953	1,953	1,953	1,953	1,953	1,953	1,953	1,953
		0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
F	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977
		0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
G	0,488	0,488	0,488	0,488	0,488	0,488	0,488	0,488	0,488	0,488	0,488	0,488
		0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5
H		0,061	0,122	0,244	0,488	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5

Após as microdiluições e adição dos inóculos, as microplacas foram incubadas à 37°C ± 1°C por 24 horas. Ao término deste período foram adicionados 20 µL de resazurina (0,01%) em cada poço. As placas foram incubadas novamente à 37°C ± 1°C por 3 horas e, posteriormente, foram determinadas as porcentagens de inibição do crescimento fúngico utilizando-se leitora de microplacas a 570 nm. As porcentagens de inibição dos crescimentos fúngicos foram calculados conforme a Equação 4.

$$\% \text{ inibição} = \left(1 - \left(\frac{\text{Absorbância do poço} - \text{Absorbância do controle negativo}}{\text{Absorbância do controle positivo} - \text{Absorbância do controle negativo}} \right) \right) \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

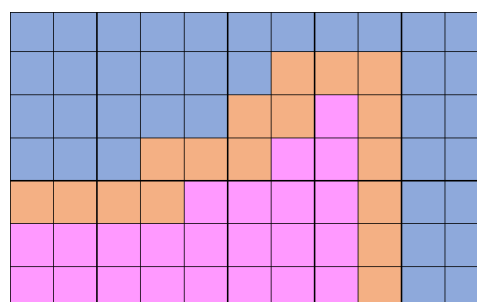
Para a avaliação das interações entre as combinações foi utilizado o método do menor Índice da Concentração Inibitória Fracionada (ICIF), conforme descrito pelo *Clinical Microbiology Procedures Handbook* (ANON, 1992). Neste método, deve-se primeiramente identificar os poços nos quais houve crescimento e não crescimento fúngico. Neste trabalho, foram considerados poços com crescimento fúngico os que apresentaram menos do que 80% de inibição do crescimento e os poços de não crescimento foram os que apresentaram mais do que 80% de inibição do crescimento fúngico. A Figura 9 mostra um esquema da microplaca com as regiões de crescimento e não crescimento.

Figura 9. Esquema da microplaca de 96 poços. Azul: poços com mais de 80% de inibição do crescimento fúngico. Rosa: poços com menos de 80% de inibição do crescimento fúngico.



A partir das regiões de crescimento e não crescimento, deve-se delimitar os poços da interface entre as duas regiões, conforme Figura 10.

Figura 10. Esquema da microplaca de 96 poços. Laranja: poços da interface de crescimento e não crescimento.



Para cada poço da interface (Figura 10 – poços em laranja), deve-se calcular as Concentrações Inibitórias Fracionadas (CIFs) para cada princípio ativo. Somando-se as CIFs dos dois princípios ativos combinados tem-se o ICIF para cada poço da interface. O cálculo das CIFs e do ICIF para cada poço da interface foi calculado conforme a Equação 5.

$$\text{ICIF} = \frac{\text{CIM do princípio ativo 1 em combinação (poço)}}{\text{CIM do princípio ativo 1 individual}} + \frac{\text{CIM do princípio ativo 2 em combinação (poço)}}{\text{CIM do princípio ativo 2 individual}} \quad \text{Equação 5}$$


 CIF princípio ativo 1


 CIF princípio ativo 2

Após os cálculos dos ICIFs dos poços da interface, foi utilizado o menor ICIF obtido para se determinar o tipo de interação existente entres os princípios ativos combinados. Valores de $\text{ICIF} \leq 0,5$ indicam interação sinérgica, valores $> 0,5$ e $< 1,0$ indicam interações parcialmente sinérgicas, valores iguais a 1,0 indicam interações aditivas, valores $> 1,0$ e $< 4,0$ indicam

interações indiferentes e valores $\geq 4,0$ indicam antagonismo (SADER; HUYNH; JONES, 2003).

É importante ressaltar que na coluna 1 e linha H estão os princípios ativos testados sozinhos, ou seja, a coluna 1 e linha H fornecerão as concentrações inibitórias mínimas individuais 80% (CIM₈₀).

4.3.2 Avaliação da citotoxicidade *in vitro* das combinações

Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* também foram realizados com as combinações dos princípios ativos propostas no item 4.3. Para estes ensaios, as células foram cultivadas da mesma forma descrita no item 4.2.3 Os fármacos foram combinados nas microplacas de 96 poços contendo a linhagem celular C33A. Os procedimentos para combinação dos princípios ativos foram realizados conforme descrito no item 4.3.1 As combinações e as concentrações finais dos princípios ativos combinados estão demonstradas nas Figuras 4(A), 5(A), 6(A), 7(A) e 8. A porcentagem de viabilidade celular nas combinações também foram calculadas conforme a Equação 2.

4.4 Desenvolvimento do sistema lipídico (SL)

Para incorporação dos princípios ativos combinados foram realizados estudos para se desenvolver um sistema capaz de atuar como veículo. Para isso, foi primeiramente construído um diagrama de fases pseudoternário composto por Captex 300® (fase oleosa), fosfatidilcolina de soja e Croduret 50® (tensoativo-co-tensoativo na proporção 25:75 m/m) e água. Foram preparados trinta e seis pontos com diferentes proporções das fases oleosa, aquosa e tensoativo/co-tensoativo (D'CRUZ; UCKUN, 2001).

Para o preparo de cada ponto do diagrama de fases pseudoternário, foram adicionados os componentes do sistema em um tubo de vidro. Esta mistura foi levada ao sonicador com amplitude de 1 e durante 5 minutos.

Após o preparo dos 36 pontos do diagrama de fases, as amostras foram deixadas em repouso por 24 horas. Posteriormente, os sistemas foram classificados visualmente em: sistema líquido transparente (SLT), sistema viscoso transparente (SVT), sistema líquido opaco (SLO), sistema viscoso opaco (SVO) e separação de fases (SF). A partir desta classificação, foram delimitadas diferentes regiões no diagrama de fases pseudoternário.

Para dar continuidade aos estudos, foi escolhido um dos pontos do diagrama de fases para incorporação dos princípios ativos estudados neste trabalho. A escolha inicial do sistema foi

feita de acordo com a viscosidade (de forma visual) e com a porcentagem de fase oleosa e tensoativo/co-tensoativo.

4.5 Caracterização física do sistema lípico (SL)

4.5.1 Análise do perfil de textura

O perfil de textura do SL desenvolvido foi avaliado utilizando-se o analisador de textura TA-XT plus (Stable Micro Systems, Inglaterra).

Foram pesados 7,0 gramas de formulação em um tubo de centrífuga cônico de 50 mL. A amostra foi centrifugada a 3500 rpm por 5 minuto para retirada de bolhas de ar e para que a superfície ficasse lisa. Após este procedimento, as amostras foram deixadas em repouso por 24 horas.

Após este período, as amostras foram mantidas abaixo da sonda analítica e em banho a 37°C. Para análise do perfil de textura foram utilizados os seguintes parâmetros: sonda analítica de 10 mm, 5 mm de distância, velocidade de compressão e de retorno de 0,5 mm/s e segunda compressão após 5 segundos. Ao final do ensaio foram avaliadas as propriedades mecânicas como dureza, compressibilidade, adesividade e coesão.

Este ensaio também foi realizado com o SL contendo 0,1% de 2-HC. Cada amostra foi analisada sete vezes independentemente e foi utilizada uma formulação comercial (clotrimazol creme vaginal 1% - Medley) para comparação dos resultados.

4.5.2 Determinação *in vitro* da força mucoadesiva

Para a avaliação da força mucoadesiva *in vitro* do SL foram utilizados discos de mucina. Primeiramente, foi preparada uma solução de mucina a 5% (p/p) em PBS. Esta solução foi mantida em agitação por 2 horas. Após este período, foram colocados 25 mL da solução em fôrmas de silicone. As fôrmas foram mantidas a 40°C por 24 horas. Após 24 horas, foram recortados discos de 0,8 mm de diâmetro.

Quanto ao SL, foram pesados 7,0 gramas em um tubo cônico de 50 mL e posteriormente, a amostra foi centrifugada a 3500 rpm por 5 minuto. Após este procedimento as amostras foram deixadas em repouso por 24 horas.

Para este ensaio, os discos foram fixados à extremidade inferior da sonda analítica do equipamento (sonda de 10 mm) utilizando-se fita dupla-face. Foram adicionados 20 µL de fluido vaginal simulado em cada disco.

O fluido vaginal simulado foi preparado conforme proposto por Owen & Katz (1999) e foi mantido em banho a 37°C. Os tubos contendo as amostras também foram mantidos em banho a 37°C.

A sonda analítica foi movimentada (velocidade de 1 mm/s) de forma que o disco de mucina ficasse próximo à superfície da amostra.

Após o contato dos discos com as amostras por 20 segundos, a sonda subiu (velocidade de 0,5 mm/s) até que houvesse o destacamento entre o disco e a amostra.

Foi avaliada a força necessária para destacar os sistemas em contato com os discos de mucina utilizando o analisador de textura TA-XT plus (Stable Micro Systems, Surrey Inglaterra), no modo Adhesion Test. A força necessária para ocorrer o destacamento foi calculada pela curva força versus tempo.

O ensaio foi conduzido sete vezes e também foi analisado o SL contendo 0,1% de 2-HC e uma formulação comercial (clotrimazol creme vaginal 1% - Medley).

4.5.3 Determinação do trabalho de seringabilidade

O SL desenvolvido foi avaliado com relação ao trabalho necessário para sua saída de dentro de uma seringa de 1 mL. Para este ensaio, foi utilizado o analisador de Textura TA- XT Plus – Stable Micro Systems (modo de compressão).

O SL foi colocado cuidadosamente dentro de seringas de plástico. A seringa foi preenchida até atingir altura de 30 mm e então, foi presa verticalmente utilizando-se uma garra. A sonda analítica do equipamento foi encostada no êmbolo da seringa e posteriormente, foi movimentada para baixo (velocidade de 2,0 mm/s). Durante a compressão do êmbolo foi determinada a resistência ao deslocamento por meio da área obtida na curva de força versus distância. O ensaio foi conduzido sete vezes e também foi analisado o SL contendo 0,1% de 2-HC e formulação comercial (clotrimazol creme vaginal 1% - Medley).

4.6 Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de 2-hidroxichalcona no sistema lipídico (SL) por espectrofotometria no UV-Visível

Para a quantificação da 2-hidroxichalcona no SL, foi desenvolvido e validado um método analítico simples, rápido e de baixo custo, utilizando-se a técnica de espectrofotometria no UV-Visível.

Primeiramente, fez-se uma varredura de comprimento de onda para visualizar os picos de absorção máxima da 2-HC e escolher o comprimento de onda a ser utilizado nas análises. Após

esta etapa, avaliou-se a influência dos componentes do sistema no comprimento de onda selecionado, de modo que estes não interfiram na quantificação do princípio ativo.

Após a definição dos principais parâmetros, o método foi validado de acordo com as diretrizes estabelecidas por órgãos nacionais e internacionais, como RDC 166/2017 (ANVISA), ISO 17025 (INMETRO), ICH (2010) e outros guias que consideram a validação de métodos analíticos, um requisito fundamental para garantir a segurança e a confiabilidade dos resultados.

O equipamento utilizado foi um espectrofotômetro UV-Visível Shimadzu Mini -1280, e a cubeta utilizada foi de quartzo, com caminho óptico de 1 cm. As soluções padrão e amostra foram diluídas em etanol.

Os parâmetros avaliados foram: especificidade/seletividade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, limite de quantificação, limite de detecção e robustez.

4.6.1 Especificidade/Seletividade

A especificidade do método analítico foi avaliada realizando-se varreduras de comprimentos de onda (200 a 600 nm) da 2-HC, da formulação (sem princípio ativo) e do diluente (etanol), com o objetivo de verificar a interferência destes no comprimento de onda estabelecido na análise.

Além disso, para verificar a influência de possíveis produtos de degradação, foram realizados testes de estresse submetendo-se a 2-HC a condições de degradação ácida, básica, oxidativa e fotólise.

Para cada condição de degradação, foram pesados 5,0 mg de 2-HC e então, transferiu-se esta quantidade para um balão volumétrico de 25 mL. Foram adicionados 3,0 mL da solução degradante (HCl 0,1 M, NaOH 0,1 M ou H₂O₂ 3%) e após 3 horas estas amostras foram diluídas em etanol. A concentração final teórica da 2-HC foi de 10,0 µg/mL.

Outra condição de degradação foi a exposição à luz. A 2-HC foi exposta à luz (356 nm) por três horas. Após este período a 2-HC foi diluída em etanol.

Foram realizadas leituras em espectrofotômetro para quantificação da 2-HC após a exposição às condições de degradação. Os resultados foram expressos em porcentagens de recuperação.

4.6.2 Linearidade e faixa linear de trabalho

A linearidade é a proporcionalidade da resposta em função da concentração, dentro de uma faixa pré-determinada, para isso, foram construídas 6 curvas analíticas independentes e em dias diferentes. Para cada curva foram preparadas nove soluções padrões de 2-HC em etanol e em diferentes concentrações: Padrão 1: 6,0 µg/mL; Padrão 2: 8,0 µg/mL; Padrão 3: 10,0 µg/mL; Padrão 4: 12,0 µg/mL, Padrão 5: 14,0 µg/mL. A linearidade do método foi avaliada relacionando-se as concentrações com as absorbâncias obtidas (gráfico da resposta em função da concentração do analito), pela análise das variâncias e teste de Cochran, equação da reta obtida pelo método dos mínimos quadrados, pelos coeficientes de correlação e de determinação, gráfico de dispersão dos resíduos e teste de Shapiro-Wilk, avaliação da significância do coeficiente linear (intercepto) e avaliação da significância do coeficiente angular, conforme é exigido pela RDC 166/2017 (ANVISA).

4.6.3 Precisão

4.6.3.1 Precisão (repetibilidade)

A precisão por repetibilidade foi verificada por meio de nove determinações independentes, nas concentrações de 8,0 µg/mL, 10,0 µg/mL e 12,0 µg/mL de 2-hidroxichalcona em etanol. As soluções foram preparadas no mesmo dia e sob as mesmas condições experimentais (método, equipamento e analista) e foi avaliada a concordância entre os resultados obtidos.

4.6.3.2 Precisão intermediária

Na avaliação da precisão intermediária, procedeu-se da mesma forma que na precisão por repetibilidade, mas em dias diferentes, e avaliou-se a concordância entre todos os resultados obtidos.

4.6.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada pela recuperação do princípio ativo na formulação. Foi utilizada a formulação desenvolvida contendo 2-hidroxichalcona na concentração de 0,1%.

Primeiramente, foram incorporados 5,0 mg de 2-HC em 5,0 g do sistema desenvolvido, ou seja, 0,1% de 2-HC. Pesou-se 1,0 g desta formulação em um balão volumétrico de 10 mL, utilizando etanol como solvente. Esta solução foi diluída, em triplicata, para as seguintes

concentrações: 8,0 µg/mL, 10,0 µg/mL e 12,0 µg/mL de 2-HC, compreendendo toda a faixa linear do método analítico.

A porcentagem de recuperação do princípio ativo na formulação foi calculada utilizando-se a Equação 6, na qual a concentração obtida corresponde à concentração encontrada usando a equação da reta obtida com a curva analítica.

$$\% \text{ de recuperação} = \frac{\text{Concentração obtida} \times 100}{\text{Concentração teórica}} \quad \text{Equação 6}$$

O critério de aceitação foi definido conforme o guia da AOAC (Association of Analytical Communities) (AOAC, 2016), o qual adota diferentes porcentagens de recuperação de acordo com a concentração do analito na amostra. Dessa forma, a porcentagem de recuperação adotada neste trabalho foi de 95,0% a 105,0%.

4.6.5 Limite de detecção e limite quantificação

O limite de detecção pode ser estabelecido analisando-se soluções com concentrações decrescentes do princípio ativo até o menor nível detectável. O limite de quantificação também pode ser obtido analisando-se concentrações decrescentes até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis (BRASIL, 2017).

O limite de detecção e quantificação foram obtidos diluindo-se a solução Padrão 1 (6,0 µg/mL) e analisando as absorbâncias obtidas. A concentração correspondente ao limite de quantificação, foi testada em triplicata e os resultados foram avaliados através do cálculo do desvio padrão relativo.

Também foram calculados o limite de detecção e de quantificação teóricos, de acordo com as Equações 7 e 8:

$$LD = 3,3 \times \sigma \times IC \quad \text{Equação 7 (Limite de detecção)}$$

$$LQ = 10 \times \sigma \times IC \quad \text{Equação 8 (Limite de quantificação)}$$

Nas quais:

IC: inclinação da curva analítica

σ : desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de detecção

4.6.6 Robustez

A robustez do método analítico foi avaliada conforme o teste proposto por Youden e Steiner (1975) que além de avaliar a robustez do método analítico, possibilita verificar quais parâmetros apresentam maior interferência no método analítico e nas respostas obtidas. A Tabela 1, mostra os fatores nominais, representados pelas letras maiúsculas de A a F (condições nominais de análise) e as variações são representadas pelas letras minúsculas correspondentes (BURIN et al., 2008).

Foram preparadas 7 amostras combinando-se as diferentes variações, conforme indicado na Tabela 2.

Tabela 1. Parâmetros alterados para avaliação da robustez do método analítico. Letras maiúsculas: condições nominais das análises. Letras minúsculas: variações provocadas.

Variáveis	
Balança (A/a)	A = Balança (Laboratório 246) a = Balança (Laboratório 228)
Marca do etanol (B/b)	B = Êxodo b = LSChemicals
Espectrofotômetro (C/c)	C = Shimadzu UV-Vis Mini 1080 c = Shimadzu UV-Vis Mini 1240
Método de dissolução (D/d)	D = Manual d = Ultrassom
Comprimento de onda (E/e)	E = 352 nm e = 350 nm
Cubeta (F/f)	F = Quartzo f = Plástico

Tabela 2. Amostras preparadas combinando-se as condições nominais de análise e diferentes alterações no método analítico.

Variável	Condições						
	1	2	3	4	5	6	7
A,a	A	A	A	A	a	a	a
B,b	B	B	b	b	B	B	b
C,c	C	c	C	c	C	c	C
D,d	D	D	d	d	d	d	D
E,e	E	e	E	e	e	E	e
F,f	F	f	f	F	F	f	f
	s	t	u	v	w	x	y

Para avaliar a interferência de cada variação, foram utilizadas as porcentagens de recuperação obtidas nas análises de cada uma das amostras acima. Os cálculos foram realizados conforme proposto por Youden e Steiner (1975).

Para cada efeito avaliado, deve-se calcular a média das porcentagens de recuperação das amostras nas condições nominais e deve-se subtrair este valor obtido pela média das porcentagens de recuperação das amostras na condição alterada, conforme o exemplo representado na Equação 9 para o efeito A/a (BURIN et al., 2008).

$$\text{Efeito A/a} = \frac{s+t+u+v}{4} - \frac{w+x+y}{3}$$

Equação 9

4.7 Eficiência de encapsulamento

Com o objetivo de avaliar a capacidade do sistema desenvolvido em solubilizar e veicular a 2-HC, foram adicionados 2% de princípio ativo em 1,0 g de formulação e homogeneizou-se o sistema que posteriormente foi centrifugado a 14000 rpm por 3 horas em tubo eppendorf. Após este período, foram pesados 200 mg da formulação, localizada na parte superior do tubo, em balão volumétrico de 25 mL e foi utilizando etanol como diluente. Foram transferidos 0,7 mL desta solução para um balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com etanol. O ensaio foi realizado em triplicata e a amostra foi quantificada conforme o método analítico validado.

4.8 Ensaios *in vivo* com *Galleria mellonella*

4.8.1 Condições gerais

Neste ensaio, foram utilizadas larvas de *G. mellonella* entre 2 a 3 cm e massa entre 225 a 275 mg, para isso, as larvas foram mantidas em potes de plástico à 25°C e alimentadas com cera de abelha e pólen até atingirem o peso necessário. Para os experimentos, foram selecionadas as larvas com coloração clara, indicando ausência de melanização. Após a seleção, as larvas foram incubadas em placas de Petri por 24 horas antes dos experimentos, a 37°C e sem alimento (SCORZONI et al., 2015).

4.8.2 Avaliação da segurança toxicológica dos compostos bioativos sozinhos, associados e do sistema lipídico

Para a avaliação da toxicidade das hidroxichalconas, suas combinações e do sistema lipídico, as larvas foram divididas em grupo controle (larvas tratadas com tampão fosfato-salino) e grupos de larvas tratadas com os compostos bioativos e suas associações. Posteriormente, as larvas foram incubadas por 24 horas conforme as condições estabelecidas por SCORZONI et al. (2015).

As larvas incubadas previamente foram submetidas a injeção de 10 µL de solução de 2-hidroxichalcona, 3'-hidroxichalcona e suas associações em tampão fosfato-salino. Após os tratamentos as larvas foram mantidas em incubação a 37°C e a sobrevivência foi avaliada diariamente, durante 7 dias. Também foram determinados diariamente os índices de saúde de cada larva para a construção da curva de morbidade e para isso foi utilizado o sistema de pontuações patológica (Tabela 3) proposto por LOH et al. (2013). Neste sistema de pontuações, quanto maior a pontuação melhor é a saúde da larva analisada (LOH et al., 2013; CHAMPION; TITBALL; BATES, 2018).

Tabela 3. Sistema de pontuação do índice de saúde.

Categoria	Descrição	Pontuação
Atividade (movimento)	Ausência de atividade	0
	Atividade mínima quando estimulada	1
	Atividade quando estimulada	2
	Atividade sem estímulo	3
Formação de casulo	Sem formação de casulo	0
	Formação de casulo (parcial)	0,5
	Formação de casulo (total)	1
Melanização	Melanização completa (larvas pretas)	0
	Pontos pretos em larva marrom	0
	≥ 3 pontos pretos em larvas beges	2
	< 3 pontos pretos em larvas beges	3
	Ausência de melanização	4
Sobrevivência	Morta	0
	Viva	2

4.8.3 Avaliação da eficácia terapêutica dos compostos bioativos sozinhos, associados e do sistema lipídico

Para a infecção das larvas de *G. mellonella* foi utilizada a cepa de *Candida albicans* ATCC 90028. As leveduras foram transferidas para caldo de infusão cérebro-coração (Acumedia Manufacturers, Michigan, USA) suplementado com glicose a 1% e foram cultivadas em um agitador por 1 dia a 150 rpm e 37°C. Após o cultivo, as células de leveduras foram lavadas três vezes com solução tampão fosfato-salino (TSF) contendo 20 mg/L de ampicilina.

Antes da infecção, a área pró-pata foi limpa com etanol a 70%. Com o auxílio de uma seringa de Hamilton, cada grupo de larvas recebeu 10 µL do inóculo (5×10^5 UFC/larva) na última pró-pata esquerda. Um grupo de larvas não infectadas e um grupo de larvas não infectadas e tratadas com TSF foram utilizados como grupos controle.

Após 1 hora da infecção das larvas de *G. mellonella* foram injetados na última pró-pata direita, 10 µL das soluções de hidroxichalconas. Os princípios ativos foram inicialmente diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) e posteriormente em TFS para o tratamento das larvas. As larvas foram incubadas a 37°C e avaliadas por 7 dias quanto a sobrevivência e utilizando-se o sistema de pontuações descrito na Tabela 3.

5 RESULTADOS E **DISCUSSÕES**

5.1 Prospecção da atividade antifúngica *in vitro* e citotoxicidade da 2-hidroxichalcona e 3'-hidroxichalcona

5.1.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Sabe-se que a resistência fúngica é um problema emergente que compromete o sucesso dos tratamentos com os medicamentos existentes. O aumento da prevalência de espécies de *Candida* não-*albicans*, que são intrinsecamente mais resistentes aos fármacos “azois”, também tornam as terapias antifúngicas ainda mais limitadas. Além disso, os antifúngicos representam uma classe de medicamentos com elevada toxicidade dessa forma, existe a necessidade de novos princípios ativos eficazes, que possam atuar contra as espécies resistentes e que apresentem baixa toxicidade (CAMPOS et al., 2020; FERRÃO et al., 2020; KRISHNASAMY et al., 2020).

Considerando isso, os princípios ativos naturais podem ser fontes de novas moléculas com potencial antifúngico assim, foram avaliadas a atividade antifúngica de dois precursores da biossíntese dos flavonoides, a 2-hidroxichalcona (2-HC) e 3'-hidroxichalcona (3'-HC).

A atividade antifúngica *in vitro* destas moléculas foi avaliada utilizando-se *Candida albicans*, por ser a espécie mais prevalente do gênero *Candida*. Também foram utilizadas as espécies não-*albicans*: *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*, por apresentarem incidência acima de 20% nos casos de candidíase diagnosticados e por serem espécies naturalmente mais resistentes à alguns fármacos (ROCHA et al, 2021).

A primeira etapa deste trabalho, após a aquisição da 2-HC e 3'-HC, foi a determinação das CIMs pelo método de microdiluição em caldo conforme CLSI (2008), e a determinação das CFMs. As CFMs foram determinadas por meio do plaqueamento dos poços nos quais não houve crescimento no ensaio de determinação da CIM. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.

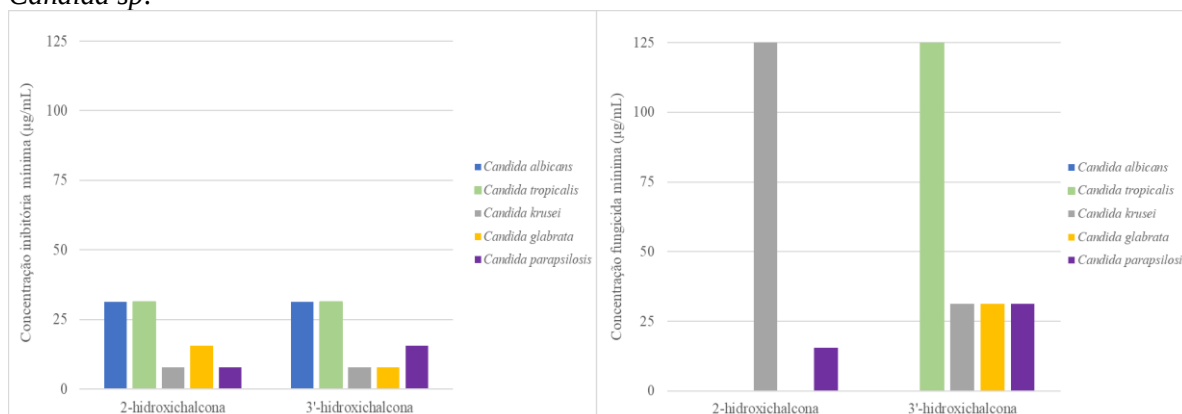
Tabela 4. Resultados das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) e Concentrações Fungicidas Mínimas (CFM) em µg/mL.

		CIM (µg/mL)	CFM (µg/mL)
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	fluconazol	0,25	> 64,0
	anfotericina B	0,20	1,0
	2-hidroxichalcona	31,25	> 125,0
	3'-hidroxichalcona	31,25	> 125,0
	clotrimazol	0,01	> 4,0
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750	fluconazol	0,50	> 64,0
	anfotericina B	0,05	1,0
	2-hidroxichalcona	31,25	> 125,0
	3'-hidroxichalcona	31,25	125,0
	clotrimazol	0,01	> 4,0
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	fluconazol	32,00	128,0
	anfotericina B	0,10	1,0
	2-hidroxichalcona	7,81	125,0
	3'-hidroxichalcona	7,81	31,3
	clotrimazol	0,06	> 4,0
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	fluconazol	0,50	> 64,0
	anfotericina B	0,40	0,5
	2-hidroxichalcona	15,63	> 125,0
	3'-hidroxichalcona	7,81	31,3
	clotrimazol	0,004	> 2,0
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	fluconazol	1,00	2,0
	anfotericina B	0,10	0,3
	2-hidroxichalcona	7,81	15,6
	3'-hidroxichalcona	15,63	31,3
	clotrimazol	0,03	0,1

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 4), os fármacos controles (anfotericina B e fluconazol) apresentaram valores de CIM conforme preconizado no CLSI (2008) para o método de microdiluição em caldo e cepas de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida krusei* ATCC 6258.

As faixas de CIMs obtidas e os valores de CFM demonstrados na Tabela 4, estão representados graficamente na Figura 11.

Figura 11. Representação gráfica das CIM e CFM em $\mu\text{g/mL}$ para 2-HC e 3'-HC frente as espécies de *Candida sp.*



A suscetibilidade das espécies de *Candida sp.* à 2-HC e 3'-HC foi avaliada pela determinação concentração inibitória mínima utilizando-se o método de microdiluição em caldo (CLSI, 2008). A determinação da CIM foi um ensaio importante para avaliar a atividade fungistática destas moléculas.

De acordo com os resultados demonstrados na Figura 11 para a 2-HC, *C. parapsilosis* e *C. krusei* apresentaram-se como as espécies mais sensíveis, seguida pelas espécies *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. albicans*. Estas duas últimas espécies apresentaram-se menos sensíveis à 2-HC pois foi necessária maior concentração de 2-HC para inibir os crescimentos fúngicos. Além disso, a *C. tropicalis* e *C. albicans* apresentaram os mesmos valores de CIM.

Para a 3'-HC, as espécies mais sensíveis foram a *C. glabrata* e *C. krusei*, seguida pelas espécies *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. albicans*. A *C. tropicalis* e *C. albicans* também se apresentaram menos sensíveis à 3'-HC e com mesmo valor de CIM necessária para inibir seus crescimentos.

A Concentração Fungicida Mínima (CFM) avalia a capacidade dos princípios ativos em causar a morte das leveduras. Quanto a atividade fungicida, a 2-HC foi capaz de causar morte das células fúngicas da *C. parapsilosis* e *C. krusei*, sendo que para esta última espécie foi necessária a maior concentração testada para causar a morte das leveduras.

Para a 3'-HC, foi observado atividade fungicida para as espécies *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis*. A *C. tropicalis* foi a espécie que necessitou de maior concentração de 3'-HC para observar morte das leveduras.

No geral, tanto a 2-HC quanto a 3'-HC apresentaram atividade fungistática dentro das faixas de concentração testadas e os perfis de susceptibilidade fúngica foram similares, no

entanto, a 3'-HC demonstrou maior espectro de ação fungicida pois foi capaz de causar a morte de maior número de espécies quando comparado à 2-HC.

Sabe-se que a *C. krusei* e *C. glabrata* são espécies intrinsecamente mais resistente ao fluconazol quando comparada às outras espécies e por isso, necessitam de maior concentração deste fármaco para inibir seus crescimentos. No entanto, estas duas espécies apresentaram-se mais sensível à 2-HC e 3'-HC em relação a *C. albicans* e *C. tropicalis*, o que nos mostra que estas moléculas são capazes de inibir o crescimento até mesmo de espécies mais resistentes aos “azóis” (ROCHA et al., 2021).

Este dado foi considerado importante pelo nosso grupo de pesquisa pois as espécies resistentes limitam as possibilidades terapêuticas disponíveis e por isso faz-se necessária a pesquisa de novos agentes antifúngicos.

Embora a *C. albicans* e *C. tropicalis* terem se apresentado mais resistentes a ação fungistática da 2-HC e 3'-HC em relação as outras espécies, os valores de CIM obtidos foram relativamente baixos. Quanto a ação fungicida, não foi observado atividade para 2-HC e para 3'-HC, foi observado somente para *C. tropicalis* na maior concentração testada.

5.1.2 Avaliação da citotoxicidade da 2-hidroxichalcona e 3'-hidroxichalcona em cultura celular monocamada

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* avalia, qualitativa e quantitativamente, as alterações metabólicas das células em cultura após sua exposição à uma determinada substância. O potencial de citotoxicidade é a primeira etapa na avaliação da biocompatibilidade e segurança de substâncias químicas para uso humano ou animal (ISO 10993). É a caracterização inicial da biocompatibilidade de substâncias que visam aplicação na prática clínica.

Nestes ensaios, as células são colocadas em contato com a substância a ser estudada e então verifica-se as alterações celulares e para isso, são frequentemente utilizados corantes vitais. As células danificadas não são coradas e assim pode-se diferenciar as células vivas das danificadas ou mortas. Dessa forma, é possível avaliar a viabilidade das células utilizando-se medidas de absorbâncias e comparações com controles de morte celular e controles de células 100% viáveis (ROGERO et al., 2003).

Para a avaliação da citotoxicidade das chalconas hidroxiladas (2-HC e 3'-HC) foi utilizada a linhagem celular C33A (epitélio de carcinoma cervical uterino). Os resultados obtidos nestes ensaios estão demonstrados nas Figuras 12 e 13.

Figura 12. Resultado da viabilidade celular (%) em relação às concentrações de 2-hidroxichalcona em $\mu\text{g/mL}$. C33A: Linhagem celular (epitélio de carcinoma cervical uterino).

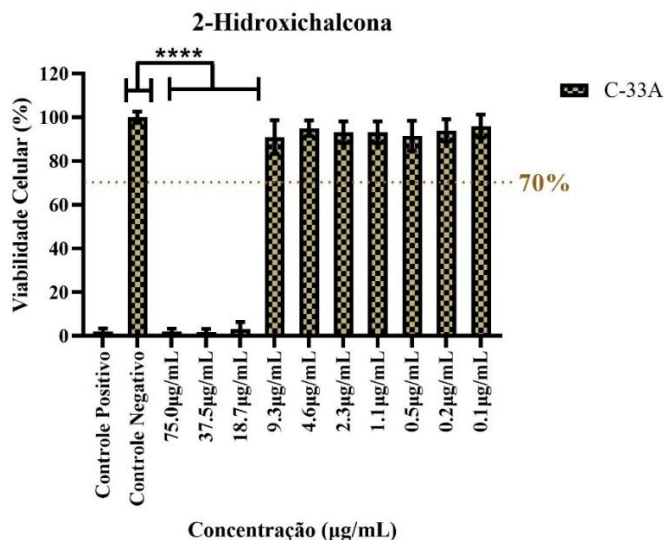
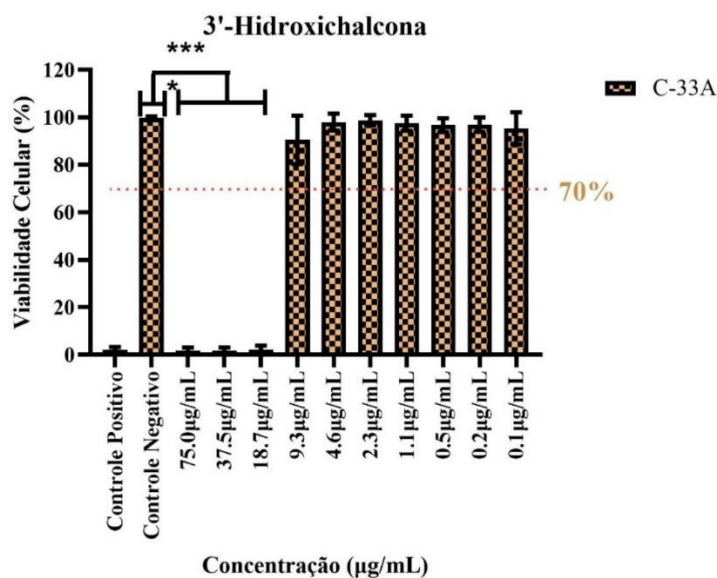


Figura 13. Resultado da viabilidade celular (%) em relação às concentrações de 3'-hidroxichalcona em $\mu\text{g/mL}$. C33A: Linhagem celular (epitélio de carcinoma cervical uterino).



No protocolo estabelecido pela ISO 10993-5 (ISO, 2009), um efeito é considerado citotóxico quando o dano causado às células reduz mais que 30% da viabilidade celular sendo assim, a não citotoxicidade é observada quando a viabilidade celular está em pelo menos 70%. Por isso, a viabilidade celular de 70% foi utilizada neste trabalho como valor mínimo para não citotoxicidade.

De acordo com os resultados representados nas Figuras 12 e 13, tanto a 2-HC quanto a 3'-HC apresentaram concentração de 9,3 µg/mL como a maior concentração na qual não foi observado efeito citotóxico, ou seja, mínimo de 70% de células viáveis.

Neste trabalho, também foram calculados os Índices de Seletividade (IS). O IS foi um parâmetro utilizado para avaliar o quanto a 2-HC e 3'-HC foram ativas contra as espécies *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* sem causar danos à viabilidade das células C33A. Para a determinação do IS, foi necessário calcular a CE₅₀ (Concentração Efetiva 50% - concentração que reduz a viabilidade celular em 50% quando comparado às células 100% viáveis). O cálculo da CE₅₀ foi feito utilizando-se o software GraphPad Prism 9.3.1. O IS foi calculado dividindo-se a CE₅₀ pela CIM₈₀ (Concentração Inibitória Mínima 80% para as células fúngicas). Para os cálculos dos IS foram utilizados os valores de CIM₈₀ demonstrados na Tabela 6 (item 5.2.1).

Os resultados obtidos das CE₅₀ e dos IS para a 2-HC e 3'-HC estão representados na Tabela 5.

Tabela 5. Valores das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM₈₀) em µg/mL, Concentração Efetiva 50% (CE₅₀) em µg/mL e Índices de Seletividade (IS) da 2-hidroxichalcona e 3'-hidroxichalcona para a espécies *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*.

	2-hidroxichalcona			3'-hidroxichalcona		
	CIM ₈₀ (µg/mL)	CE ₅₀ (µg/mL)	IS	CIM ₈₀ (µg/mL)	CE ₅₀ (µg/mL)	IS
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	31,25		0,5	31,25		0,4
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	31,25	14,98	0,5	62,50	11,62	0,2
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	31,25		0,5	15,63		0,7

A CE₅₀ e o IS são importantes para que se possa ter uma estimativa de janela terapêutica. Valores de IS acima de 10 são indicativos de ausência de toxicidade enquanto valores abaixo de 10 são indicativos de toxicidade (PROTOPOPOVA et al., 2005).

De acordo com os resultados da Tabela 5, a CE₅₀ foi de 14,98 µg/mL para 2-HC e 11,62 µg/mL para 3'-HC. Conforme estes resultados, a 3'-HC mostrou-se mais citotóxica do que a 2-HC pois foi necessária uma concentração menor de 3'-HC para reduzir a viabilidade celular em 50%. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos na avaliação da atividade antifúngica *in vitro*, nos quais a 3'-HC apresentou melhor atividade fungicida em relação à 2-HC e por isso, também se apresentou mais citotóxica.

Quanto aos IS, todos apresentaram valores menores que 10 e por isso, tem-se indicativo de toxicidade para as células do hospedeiro tanto com a 2-HC quanto 3'-HC, ou seja, não foi observada toxicidade seletiva pelas células fúngicas.

Uma característica muito importante de um bom agente antimicrobiano é a sua capacidade de atuar de forma seletiva sobre os microrganismos sem causar danos às células do hospedeiro. Muitos princípios ativos antifúngicos atuam ligando-se no ergosterol presente na membrana das células fúngicas e com isso aumentam a sua permeabilidade, o que leva à morte celular. Sabe-se que o colesterol é um dos componentes presentes na membrana celular dos mamíferos e é análogo ao ergosterol presente na membrana das células fúngicas, por isso a toxicidade seletiva é difícil de ser atingida.

De acordo com os resultados obtidos, a maior concentração não citotóxica foi de 9,3 µg/mL no entanto, as concentrações inibitórias mínimas necessárias para inibir o crescimento das espécies de *Candidas* foram maiores que este valor, ou seja, as CIMs obtidas são citotóxica para as células do hospedeiro.

Diante disso, também foram realizados ensaios de atividade antifúngica combinatória e citotoxicidade das combinações propostas neste trabalho. Os ensaios de citotoxicidade das combinações foram conduzidos com o objetivo de aumentar a atividade antifúngica e reduzir a citotoxicidade dos princípios ativos por meio das combinações propostas (aumento da toxicidade seletiva para as células fúngicas).

5.2 Prospecção da atividade antifúngica *in vitro* combinatória e citotoxicidade das combinações

5.2.1 Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica combinatória

As terapias antimicrobianas combinadas são práticas clínicas muito utilizadas nas quais combinam-se dois agentes antimicrobianos. Esta prática apresenta diversas vantagens que consistem em ampliar o espectro de ação, melhorar os resultados clínicos (devido ao sinergismo entre os dois fármacos), reduzir e/ou impedir o surgimento de cepas resistentes e otimizar o uso dos medicamentos já existentes resgatando sua efetividade frente às infecções e até mesmo, reduzir as doses necessárias dos antimicrobianos convencionais, o que leva a diminuição da toxicidade e dos efeitos colaterais.

Neste sentido, as terapias combinadas são importantes recursos empregados em casos de infecções graves causadas por microrganismos multirresistentes como opção à monoterapia. Um estudo de revisão realizado por Tzouveleakis et al. (2014) demonstrou que quando a terapia combinada foi utilizada houve aumento da sobrevida em pacientes com infecções graves. De

acordo com Hsieh et al. (1993) a utilização de combinações sinérgicas de antimicrobianos são terapias preferenciais para infecções graves.

Portanto, neste trabalho foram avaliadas a atividade antifúngica *in vitro* dos compostos bioativos 2-HC e 3'-HC em combinação com fluconazol, clotrimazol e combinados entre si. Para estes ensaios foram utilizadas as espécies *C. albicans* ATCC 90028, *C. tropicalis* ATCC 750 e *C. krusei* ATCC 6258.

C. tropicalis e *C. krusei* foram as espécies escolhidas como representante das espécies não-*albicans*. *C. tropicalis* apresenta maior prevalência na América Latina, sendo a segunda espécie mais prevalente após *C. albicans*. *C. krusei*, além de também apresentar alta prevalência, é uma espécie intrinsecamente menos sensível aos antifúngicos “azóis” (ROCHA et al., 2021).

Nos ensaios da avaliação *in vitro* da atividade antifúngica combinatória, primeiramente foram determinadas as porcentagens de inibição de cada combinação e então, foram considerados somente as combinações que apresentaram acima de 80% de inibição do crescimento fúngico. Utilizando-se estes poços nos quais foram observados acima de 80% de inibição, traçou-se uma interface de poços de inibição do crescimento “desejável” e “não desejável”.

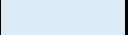
Posteriormente, foram calculadas as CIFs e os ICIFs de cada poço da interface. Para determinar a interação existente entre os fármacos combinados, utilizou-se o menor valor do ICIF obtido na interface (método do menor Índice).

As Figuras 14 (A e B), 15 (A e B), 16 (A e B), 17 (A e B) e 18 (A e B) demonstram os resultados obtidos para a espécie *C. albicans* na respectiva ordem de combinações: 2-HC com fluconazol, 2-HC com clotrimazol, 3'-HC com fluconazol, 3'-HC com clotrimazol e 3'-HC com 2-HC.

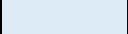
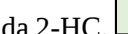
As Figuras 19 (A e B), 20 (A e B), 21 (A e B), 22 (A e B) e 23 (A e B) demonstram os resultados obtidos com a espécie *C. tropicalis*, seguindo a mesma ordem de combinações. As Figuras 24 (A e B), 25 (A e B), 26 (A e B), 27 (A e B) e 28 (A e B) demonstram os resultados obtidos para a espécie *C. krusei*, também seguindo a mesma ordem de combinações.

As figuras representam um esquema da microplaca de 96 poços sendo que cada quadrado das figuras representam um poço. Nas figuras com a letra “A”, estão representadas as matrizes de inibição dos crescimentos fúngicos com as porcentagens de inibição (valores em negrito) e as concentrações dos fármacos nas combinações.

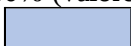
Nas figuras com a letra “B”, estão demonstrados os poços das interfaces de inibição crescimento “desejável” (acima de 80%) e inibição “não desejável” (abaixo de 80% - quadrados em rosa), as CIFs de cada princípio ativo e os ICIFs de cada poço.

Figura 14. (A): Matriz de porcentagens de inibição do crescimento da *C. albicans* na combinação da 2-HC com fluconazol.  -Porcentagens de inibição abaixo de 80%.  -Porcentagens de inibição acima de 80% (valores em negrito/média de três experimento).  -Concentração de fluconazol em µg/mL.  -Concentração da 2-HC em µg/mL.

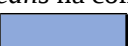
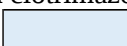
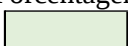
100,45	96,80	97,11	98,90	90,96	96,60	103,76	104,69	106,38	103,81	104,74
4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
97,65	94,99	99,43	99,84	99,16	99,31	105,80	107,69	111,42	104,07	102,09
2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
95,02	95,10	98,19	96,99	94,60	95,12	90,11			91,93	98,24
1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00			1,00	1,00
0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91			31,25	62,50
102,16	91,12	93,30	93,88	93,20	87,83				92,00	101,47
0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50				0,50	0,50
0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95				31,25	62,50
92,71	90,34	96,16	88,90	84,53					99,58	98,25
0,25	0,25	0,25	0,25	0,25					0,25	0,25
0,06	0,12	0,24	0,49	0,98					31,3	62,5
		80,15							96,39	100,18
		0,13							0,13	0,13
		0,24							31,25	62,50
									95,22	99,74
									0,06	0,06
									31,25	62,50

Figura 14. (B): Interface entre crescimento “desejável” (acima de 80%) e crescimento não desejável (abaixo de 80%) para *C. albicans* na combinação da 2-HC com fluconazol.  -Porcentagens de inibição abaixo de 80%.  -CIF do fluconazol.  -CIF da 2-HC.  -ICIF.

							4,00	4,00	4,00	
							0,25	0,50	1,00	
							4,25	4,50	5,00	
						2,00			2,00	
						0,13			1,00	
						2,13			3,00	
					1,00				1,00	
					0,06				1,00	
					1,06				2,00	
0,50	0,50	0,50	0,50	0,50					0,50	
0,002	0,004	0,01	0,02	0,03					1,00	
0,50	0,50	0,51	0,52	0,53					1,50	
		0,25							0,25	
		0,01							1,00	
		0,26							1,25	
									0,13	
									1,00	
									1,13	

Figura 15. (A): Matriz de porcentagens de inibição do crescimento da *C. albicans* na combinação da 2-HC com clotrimazol.  -Porcentagens de inibição abaixo de 80%.  -Porcentagens de inibição acima de 80% (valores em negrito/média de três experimento).  -Concentração de clotrimazol µg/mL.  -Concentração da 2-HC em µg/mL.

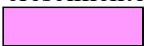
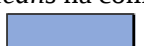
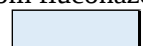
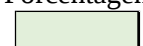
101,16	95,69	96,20	91,33	94,83	98,28	102,42	101,53	105,54	103,65	93,60
0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
91,24	95,38	93,59	81,33	87,30	86,34	80,62	98,57	85,74	99,48	99,13
0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063
0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
88,15	80,67				81,93		86,79	87,51	95,87	99,66
0,031	0,031				0,031		0,031	0,031	0,031	0,031
0,06	0,12				1,95		7,81	15,63	31,25	62,50
83,25									102,10	101,12
0,016									0,016	0,016
0,06									31,25	62,50
									102,89	99,60
									0,008	0,008
									31,25	62,50
									96,43	99,32
									0,004	0,004
									31,25	62,50
									101,48	101,02
									0,002	0,002
									31,25	62,50

Figura 15. (B): Interface entre crescimento “desejável” (acima de 80%) e crescimento não desejável (abaixo de 80%) para *C. albicans* na combinação da 2-HC com clotrimazol.  -Porcentagens de inibição abaixo de 80%.  -CIF do clotrimazol.  -CIF da 2-HC.  -ICIF.

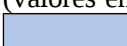
	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00			
	0,004	0,01	0,02	0,03	0,06	0,13	0,25			
	2,00	2,00	2,01	2,03	2,06	2,12	2,25			
1,00	1,00				1,00		1,00	1,00	1,00	
0,002	0,004				0,06		0,25	0,50	1,00	
1,00	1,00				1,06		1,25	1,50	2,00	
0,50									0,50	
0,002									1,00	
0,50									1,50	
									0,25	
									1,00	
									1,25	
									0,12	
									1,00	
									1,12	
									0,06	
									1,00	
									1,06	

Figura 16. (A): Matriz de porcentagens de inibição do crescimento da *C. albicans* na combinação da 3'-HC com fluconazol.  -Porcentagens de inibição abaixo de 80%.  - Porcentagens de inibição acima de 80% (valores em negrito/média de três experimento).  - Concentração de fluconazol em µg/mL.  -Concentração da 3'-HC em µg/mL.

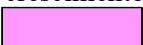
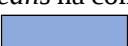
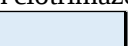
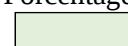
91,00	89,94	90,35	88,23	93,71	92,04	97,11	96,79	99,64	98,69	97,35
4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
91,55	94,58	93,66	92,20	91,53	98,71	100,54	101,33	101,08	102,04	102,18
2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
90,50	92,57	91,15	89,37	93,37	86,36	88,18		80,17	100,28	100,89
1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00
0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91		15,63	31,25	62,50
99,02	89,08	100,55		112,98	83,68			80,11	100,75	101,41
0,50	0,50	0,50		0,50	0,50			0,50	0,50	0,50
0,06	0,12	0,24		0,98	1,95			15,63	31,25	62,50
87,06	87,77	84,05	84,00					91,56	93,25	86,55
0,25	0,25	0,25	0,25					0,25	0,25	0,25
0,06	0,12	0,24	0,49					15,63	31,25	62,50
									102,42	85,41
									0,13	0,13
									31,25	62,50
								88,04	102,04	100,97
								0,06	0,06	0,06
								15,63	31,25	62,50

Figura 16. (B): Interface entre crescimento “desejável” (acima de 80%) e crescimento não desejável (abaixo de 80%) para *C. albicans* na combinação da 3'-HC com fluconazol.  -Porcentagens de inibição abaixo de 80%.  -CIF do fluconazol.  -CIF da 3'-HC.  - ICIF.

						4,00	4,00	4,00		
						0,13	0,25	0,50		
						4,13	4,25	4,50		
		2,00	2,00	2,00	2,00	2,00		2,00		
		0,01	0,02	0,03	0,06	0,13		0,50		
		2,01	2,02	2,03	2,06	2,13		2,50		
		1,00		1,00	1,00			1,00		
		0,01		0,03	0,06			0,50		
		1,01		1,03	1,06			1,50		
0,50	0,50	0,50	0,50					0,50	0,50	
0,002	0,004	0,01	0,02					0,50	1,00	
0,50	0,50	0,51	0,52					1,00	1,50	
									0,25	
									1,00	
									1,25	
								0,13	0,13	
								0,50	1,00	
								0,63	1,13	

Figura 17. (A): Matriz de porcentagens de inibição do crescimento da *C. albicans* na combinação da 3'-HC com clotrimazol.  -Porcentagens de inibição abaixo de 80%.  - Porcentagens de inibição acima de 80% (valores em negrito/média de três experimento).  - Concentração de clotrimazol em µg/mL.  -Concentração da 3'-HC em µg/mL.

86,95	94,06	90,10	87,13	89,75	92,91	92,12	95,26	90,74	98,21	97,81
0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
80,18	86,99	88,31	88,01	86,62	91,38	86,65		81,98	99,12	98,69
0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063		0,063	0,063	0,063
0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91		15,63	31,25	62,50
80,33	83,19							87,01	99,26	98,41
0,031	0,031							0,031	0,031	0,031
0,06	0,12							15,63	31,25	62,50
								83,46	97,30	96,92
								0,016	0,016	0,016
								15,63	31,25	62,50
								86,14	98,22	95,95
								0,008	0,008	0,008
								15,63	31,25	62,50
								80,87	97,27	97,29
								0,004	0,004	0,004
								15,63	31,25	62,50
								88,03	97,65	94,79
								0,002	0,002	0,002
								15,63	31,25	62,50

Figura 17. (B): Interface entre crescimento “desejável” (acima de 80%) e crescimento não desejável (abaixo de 80%) para *C. albicans* na combinação da 3'-HC com clotrimazol.  -Porcentagens de inibição abaixo de 80%.  -CIF do clotrimazol.  -CIF da 3'-HC.  - ICIF.

						3,99	3,99	3,99		
						0,13	0,25	0,50		
						4,12	4,24	4,49		
	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00		2,00		
	0,004	0,01	0,02	0,03	0,06	0,13		0,50		
	2,00	2,00	2,01	2,03	2,06	2,12		2,50		
1,00	1,00							1,00		
0,002	0,004							0,50		
1,00	1,00							1,50		
								0,50		
								0,50		
								1,00		
								0,25		
								0,50		
								0,75		
								0,12		
								0,50		
								0,62		
								0,06		
								0,50		
								0,56		

Figura 18. (A): Matriz de porcentagens de inibição do crescimento da *C. albicans* na combinação da 3'-HC com 2-HC.  -Porcentagens de inibição abaixo de 80%.  -Porcentagens de inibição acima de 80% (valores em negrito/média de três experimento).  -Concentração da 3'-HC em µg/mL.  -Concentração da 2-HC em µg/mL.

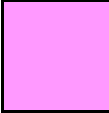
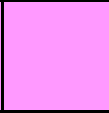
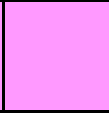
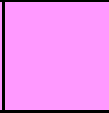
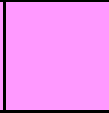
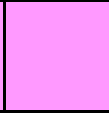
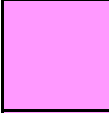
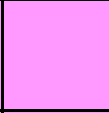
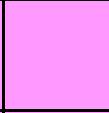
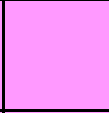
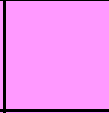
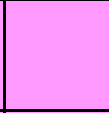
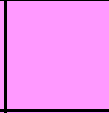
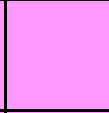
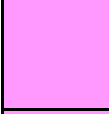
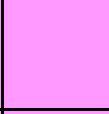
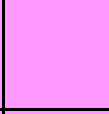
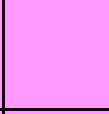
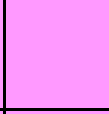
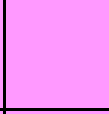
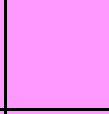
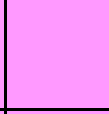
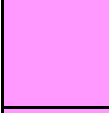
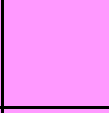
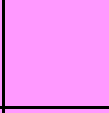
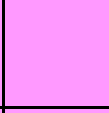
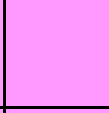
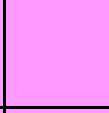
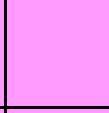
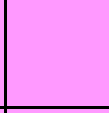
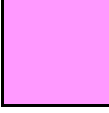
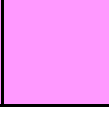
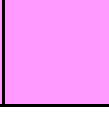
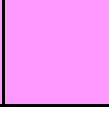
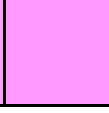
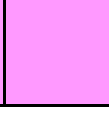
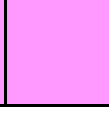
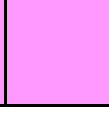
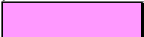
90,37	93,94	94,77	96,88	93,91	93,22	97,18	96,52	96,09	96,53	94,17
31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25
0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
94,22	94,37	94,94	97,74	95,80	104,56	98,72	98,54	97,08	97,01	95,52
15,63	15,63	15,63	15,63	15,63	15,63	15,63	15,63	15,63	15,63	15,63
0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
						80,59	93,65	96,16	96,73	94,00
						7,81	7,81	7,81	7,81	7,81
						3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
								93,49	93,69	95,17
								3,91	3,91	3,91
								15,63	31,25	62,50
								87,60	91,11	92,61
								1,95	1,95	1,95
								15,63	31,25	62,50
								83,23	91,29	89,50
								0,98	0,98	0,98
								15,63	31,25	62,50
								89,24	91,99	
								0,49	0,49	
								31,25	62,50	

Figura 18. (B): Interface entre crescimento “desejável” (acima de 80%) e crescimento não desejável (abaixo de 80%) para *C. albicans* na combinação da 3'-HC com 2-HC.  -Porcentagens de inibição abaixo de 80%.  -CIF da 3'-HC.  -CIF da 2-HC.  -ICIF.

											
0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50					
0,002	0,004	0,01	0,02	0,03	0,06	0,13					
0,50	0,50	0,51	0,52	0,53	0,56	0,63					
						0,25	0,25	0,25			
						0,13	0,25	0,50			
						0,38	0,50	0,75			
								0,13			
								0,50			
								0,63			
								0,06			
								0,50			
								0,56			
								0,03	0,03		
								0,50	1,00		
								0,53	1,03		
									0,02		
									1,00		
									1,02		

Figura 19. (A): Matriz de porcentagens de inibição do crescimento da *C. tropicalis* na combinação da 2-HC com fluconazol.  -Porcentagens de inibição abaixo de 80%.  -Porcentagens de inibição acima de 80% (valores em negrito/média de três experimento).  -Concentração de fluconazol em $\mu\text{g/mL}$.  -Concentração da 2-HC em $\mu\text{g/mL}$.

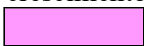
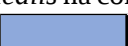
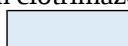
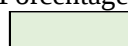
90,92	87,70	91,14	91,18	93,62	92,65	80,45			80,59	83,31
4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00			4,00	4,00
0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91			31,25	62,50
85,90	81,82	89,75	89,94	92,94					81,36	84,09
2,00	2,00	2,00	2,00	2,00					2,00	2,00
0,06	0,12	0,24	0,49	0,98					31,25	62,50
90,20	88,96	91,22	89,30						80,13	81,92
1,00	1,00	1,00	1,00						1,00	1,00
0,06	0,12	0,24	0,49						31,25	62,50
88,36	88,95								80,69	84,96
0,50	0,50								0,50	0,50
0,06	0,12								31,25	62,50
									84,35	85,16
									0,25	0,25
									31,25	62,50
									82,51	86,69
									0,13	0,13
									31,25	62,50
									83,45	85,89
									0,06	0,06
									31,25	62,50

Figura 19. (B): Interface entre crescimento “desejável” (acima de 80%) e crescimento não desejável (abaixo de 80%) para *C. tropicalis* na combinação da 2-HC com fluconazol.  -Porcentagens de inibição abaixo de 80%.  -CIF do fluconazol.  -CIF da 2-HC.  -ICIF.

				8,00	8,00	8,00			8,00	
				0,03	0,06	0,13			1,00	
				8,03	8,06	8,13			9,00	
			4,00	4,00					4,00	
			0,02	0,03					1,00	
			4,02	4,03					5,00	
	2,00	2,00	2,00						2,00	
	0,00	0,01	0,02						1,00	
	2,00	2,01	2,02						3,00	
1,00	1,00								1,00	
0,002	0,004								1,00	
1,00	1,00								2,00	
									0,50	
									1,00	
									1,25	
									0,13	
									1,00	
									1,13	

Figura 20. (A): Matriz de porcentagens de inibição do crescimento da *C. tropicalis* na combinação da 2-HC com clotrimazol.  -Porcentagens de inibição abaixo de 80%.  - Porcentagens de inibição acima de 80% (valores em negrito/média de três experimento).  - Concentração do clotrimazol em µg/mL.  -Concentração da 2-HC em µg/mL.

91,54	93,57	94,28	92,64						83,40	91,20
0,13	0,13	0,13	0,13						0,13	0,13
0,06	0,12	0,24	0,49						31,25	62,50
86,67	87,48		80,66						87,42	95,23
0,06	0,06		0,06						0,06	0,06
0,06	0,12		0,49						31,25	62,50
									81,19	93,73
									0,03	0,03
									31,25	62,50
									83,11	93,71
									0,02	0,02
									31,25	62,50
									86,36	92,56
									0,01	0,01
									31,25	62,50
									82,22	93,19
									0,004	0,004
									31,25	62,50
								80,59	89,15	92,28
								0,002	0,002	0,002
								15,63	31,25	62,50

Figura 20. (B): Interface entre crescimento “desejável” (acima de 80%) e crescimento não desejável (abaixo de 80%) para *C. tropicalis* na combinação da 2-HC com clotrimazol.  -Porcentagens de inibição abaixo de 80%.  -CIF do clotrimazol.  -CIF da 2-HC.  - ICIF.

	4,00	4,00	4,00						4,00	
	0,004	0,01	0,02						1,00	
	4,00	4,01	4,02						5,00	
2,00	2,00		2,00						2,00	
0,002	0,004		0,02						1,00	
2,00	2,00		2,02						3,00	
									1,00	
									1,00	
									2,00	
									0,50	
									1,00	
									1,50	
									0,25	
									1,00	
									1,25	
									0,12	
									1,00	
									1,12	
								0,06	0,06	
								0,50	1,00	
								0,56	1,06	

Figura 21. (A): Matriz de porcentagens de inibição do crescimento da *C. tropicalis* na combinação da 3'-HC com fluconazol.  -Porcentagens de inibição abaixo de 80%.  - Porcentagens de inibição acima de 80% (valores em negrito/média de três experimento).  - Concentração do fluconazol em µg/mL.  -Concentração da 3'-HC em µg/mL.

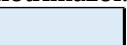
95,46	89,81	89,91	88,31	90,55	88,11	80,55			82,82	91,83
4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00			4,00	4,00
0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91			31,25	62,50
100,58	95,77	89,65	90,48	89,74	85,44				80,95	91,12
2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00				2,00	2,00
0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95				31,25	62,50
89,54	90,15	87,95	88,94							92,27
1,00	1,00	1,00	1,00							1,00
0,06	0,12	0,24	0,49							62,50
83,68	89,01	88,10	84,28						82,30	91,08
0,50	0,50	0,50	0,50						0,50	0,50
0,06	0,12	0,24	0,49						31,25	62,50
89,51									86,15	90,03
0,25									0,25	0,25
0,06									31,25	62,50
									80,93	90,45
									0,13	0,13
									31,25	62,50
										92,24
										0,06
										62,50

Figura 21. (B): Interface entre crescimento “desejável” (acima de 80%) e crescimento não desejável (abaixo de 80%) para *C. tropicalis* na combinação da 3'-HC com fluconazol.  -Porcentagens de inibição abaixo de 80%.  -CIF do fluconazol.  -CIF da 3'-HC.  - ICIF.

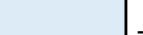
					8,00	8,00			8,00	
					0,031	0,063			0,50	
					8,03	8,06			8,50	
			4,00	4,00	4,00				4,00	4,00
			0,008	0,016	0,031				0,50	1,00
			4,01	4,02	4,03				4,50	5,00
			2,00							2,00
			0,008							1,00
			2,01							3,00
1,00	1,00	1,00	1,00						1,00	1,00
0,001	0,002	0,004	0,008						0,50	1,00
1,00	1,00	1,00	1,01						1,50	2,00
0,50									0,50	
0,001									0,50	
0,50									1,00	
									0,25	0,25
									0,50	1,00
									0,75	1,25
										0,13
										1,00
										1,13

Figura 22. (A): Matriz de porcentagens de inibição do crescimento da *C. tropicalis* na combinação da 3'-HC com clotrimazol.  -Porcentagens de inibição abaixo de 80%.  - Porcentagens de inibição acima de 80% (valores em negrito/média de três experimento).  - Concentração do clotrimazol em µg/mL.  -Concentração da 3'-HC em µg/mL.

92,10	92,91	89,29								89,14
0,13	0,13	0,13								0,13
0,06	0,12	0,24								62,50
										88,85
										0,06
										62,50
										88,74
										0,03
										62,50
										89,35
										0,02
										62,50
										89,09
										0,01
										62,50
										89,50
										0,004
										62,50
										88,74
										0,002
										62,50

Figura 22. (B): Interface entre crescimento “desejável” (acima de 80%) e crescimento não desejável (abaixo de 80%) para *C. tropicalis* na combinação da 3'-HC com clotrimazol.  - Porcentagens de inibição abaixo de 80%.  -CIF do clotrimazol.  -CIF da 3'-HC.  -ICIF.

3,99	3,99	3,99								3,99
0,001	0,002	0,004								1,00
3,99	4,00	4,00								4,99
										2,00
										1,00
										3,00
										1,00
										1,00
										2,00
										0,50
										1,00
										1,50
										0,25
										1,00
										1,25
										0,12
										1,00
										1,12
										0,06
										1,00
										1,06

Figura 23. (A): Matriz de porcentagens de inibição do crescimento da *C. tropicalis* na combinação da 3'-HC com 2-HC.  -Porcentagens de inibição abaixo de 80%.  -Porcentagens de inibição acima de 80% (valores em negrito/média de três experimento).  -Concentração da 3'-HC em µg/mL.  -Concentração da 2-HC em µg/mL.

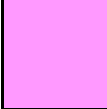
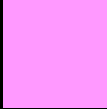
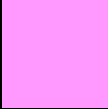
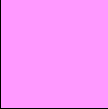
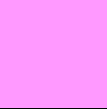
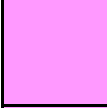
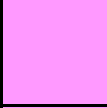
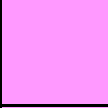
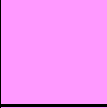
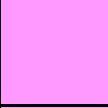
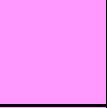
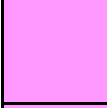
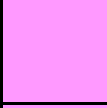
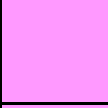
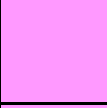
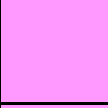
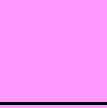
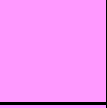
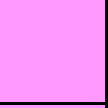
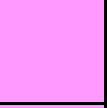
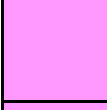
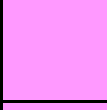
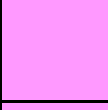
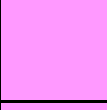
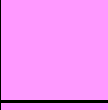
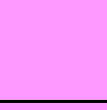
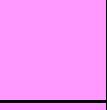
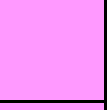
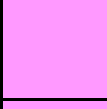
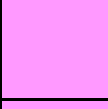
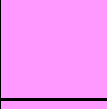
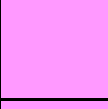
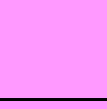
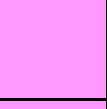
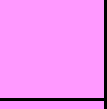
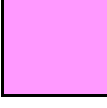
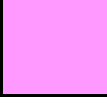
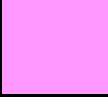
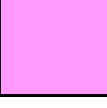
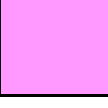
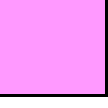
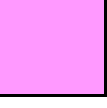
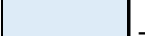
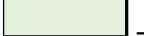
99,58	96,73	98,34	101,47	99,45	98,82	102,49	98,15	99,20	98,73	95,13
31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25
0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
						82,36	88,07	96,66	97,01	96,60
						15,63	15,63	15,63	15,63	15,63
						3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
								83,26	92,14	95,09
								7,81	7,81	7,81
								15,63	31,25	62,50
									85,48	95,18
									3,91	3,91
									31,25	62,50
										87,71
										1,95
										62,50
										84,39
										0,98
										62,50
										85,92
										0,49
										62,50

Figura 23. (B): Interface entre crescimento “desejável” (acima de 80%) e crescimento não desejável (abaixo de 80%) para *C. tropicalis* na combinação da 3'-HC com 2-HC.  -Porcentagens de inibição abaixo de 80%.  -CIF da 3'-HC.  -CIF da 2-HC.  -ICIF.

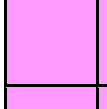
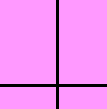
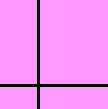
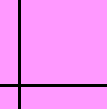
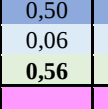
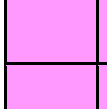
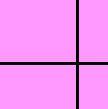
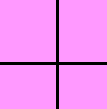
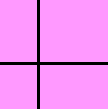
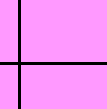
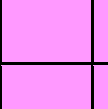
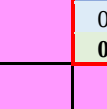
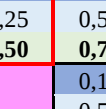
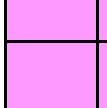
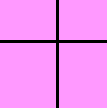
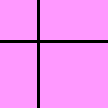
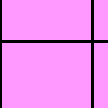
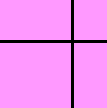
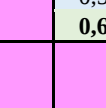
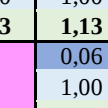
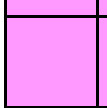
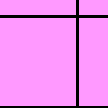
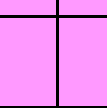
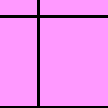
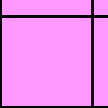
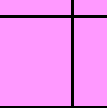
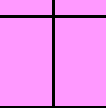
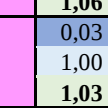
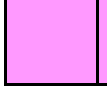
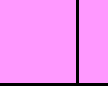
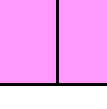
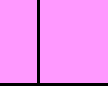
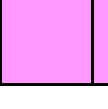
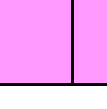
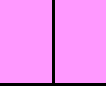
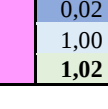
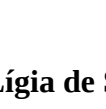
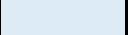
1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00				
0,001	0,002	0,004	0,01	0,02	0,03	0,06				
1,00	1,00	1,00	1,01	1,02	1,03	1,06				
						0,50	0,50	0,50		
						0,06	0,13	0,25		
						0,56	0,63	0,75		
								0,25	0,25	
								0,25	0,50	
								0,50	0,75	
									0,13	0,13
									0,50	1,00
									0,63	1,13
									0,06	
									1,00	
									1,06	
									0,03	
									1,00	
									1,03	
									0,02	
									1,00	
									1,02	

Figura 24. (A): Matriz de porcentagens de inibição do crescimento da *C. krusei* na combinação da 2-HC com fluconazol.  -Porcentagens de inibição abaixo de 80%.  -Porcentagens de inibição acima de 80% (valores em negrito/média de três experimento).  -Concentração do fluconazol em µg/mL.  -Concentração da 2-HC em µg/mL.

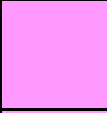
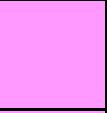
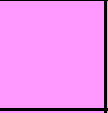
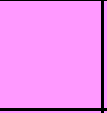
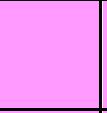
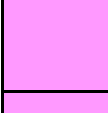
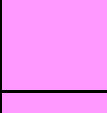
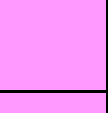
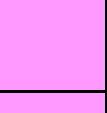
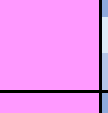
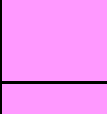
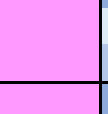
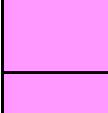
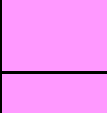
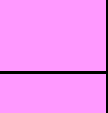
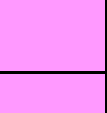
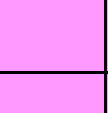
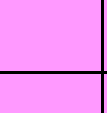
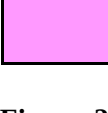
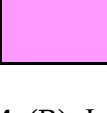
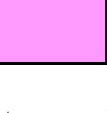
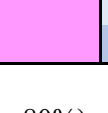
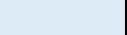
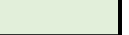
101,44	100,51	103,25	99,89	101,33	91,10	102,93	103,40	104,27	101,33	101,13
32,00	32,00	32,00	32,00	32,00	32,00	32,00	32,00	32,00	32,00	32,00
0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
								96,37	98,13	95,05
								16,00	16,00	16,00
								15,63	31,25	62,50
								95,45	98,19	102,01
								8,00	8,00	8,00
								15,63	31,25	62,50
								93,94	91,17	98,26
								4,00	4,00	4,00
								15,63	31,25	62,50
								87,39	93,65	100,00
								2,00	2,00	2,00
								15,63	31,25	62,50
								84,95	95,08	98,31
								1,00	1,00	1,00
								15,63	31,25	62,50
								92,14	99,15	102,78
								0,50	0,50	0,50
								15,63	31,25	62,50

Figura 24. (B): Interface entre crescimento “desejável” (acima de 80%) e crescimento não desejável (abaixo de 80%) para *C. krusei* na combinação da 2-HC com fluconazol.  -Porcentagens de inibição abaixo de 80%.  -CIF do fluconazol.  -CIF da 2-HC.  -ICIF.

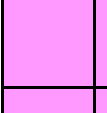
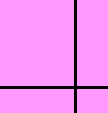
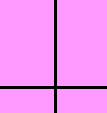
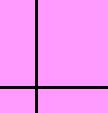
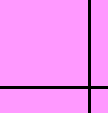
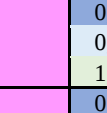
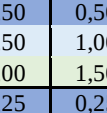
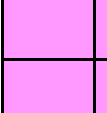
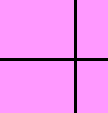
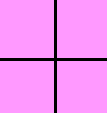
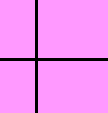
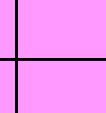
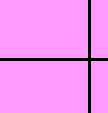
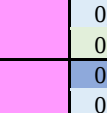
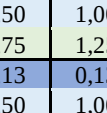
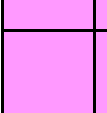
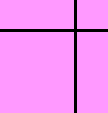
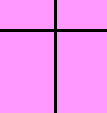
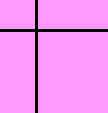
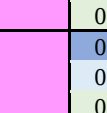
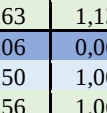
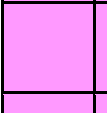
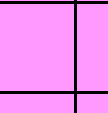
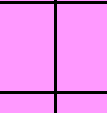
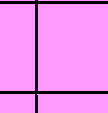
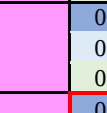
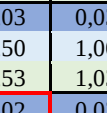
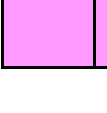
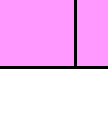
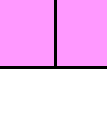
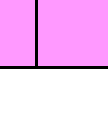
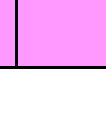
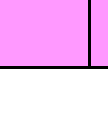
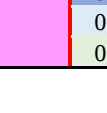
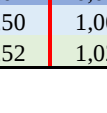
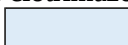
1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
0,002	0,00	0,01	0,02	0,03	0,06	0,13	0,25	0,50	1,00	2,00
1,00	1,00	1,01	1,02	1,03	1,06	1,13	1,25	1,50	2,00	3,00
								0,50	0,50	0,50
								0,50	1,00	2,00
								1,00	1,50	2,50
								0,25	0,25	0,25
								0,50	1,00	2,00
								0,75	1,25	2,25
								0,13	0,13	0,13
								0,50	1,00	2,00
								0,63	1,13	2,13
								0,06	0,06	0,06
								0,50	1,00	2,00
								0,56	1,06	2,06
								0,03	0,03	0,03
								0,50	1,00	2,00
								0,53	1,03	2,03
								0,02	0,02	0,02
								0,50	1,00	2,00
								0,52	1,02	2,02

Figura 25. (A): Matriz de porcentagens de inibição do crescimento da *C. krusei* na combinação da 2-HC com clotrimazol.  -Porcentagens de inibição abaixo de 80%.  -Porcentagens de inibição acima de 80% (valores em negrito/média de três experimento).  -Concentração do clotrimazol em µg/mL.  -Concentração da 2-HC em µg/mL.

101,21	99,61	92,28	99,66	99,89	95,26	95,39	95,95	98,56	101,78	99,01
0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
99,81	106,75	96,82	96,99	98,25	95,66	97,88	93,29	95,38	99,36	101,54
0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
92,95	85,12		87,73	85,36					96,24	100,41
0,13	0,13		0,13	0,13					0,13	0,13
0,06	0,12		0,49	0,98					31,25	62,50
									97,42	101,44
									0,06	0,06
									31,25	62,50
									95,57	99,78
									0,03	0,03
									31,25	62,50
									98,52	99,36
									0,02	0,02
									31,25	62,50
									96,80	100,42
									0,01	0,01
									31,25	62,50

Figura 25. (B): Interface entre crescimento “desejável” (acima de 80%) e crescimento não desejável (abaixo de 80%) para *C. krusei* na combinação da 2-HC com clotrimazol.  -Porcentagens de inibição abaixo de 80%.  -CIF do clotrimazol.  -CIF da 2-HC.  -ICIF.

4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
0,002	0,004	0,01	0,02	0,03	0,06	0,13	0,25	0,50	1,00	2,00
4,00	4,00	4,01	4,02	4,03	4,06	4,13	4,25	4,50	5,00	6,00
2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
0,002	0,004	0,01	0,02	0,03	0,06	0,13	0,25	0,50	1,00	2,00
2,00	2,00	2,01	2,02	2,03	2,06	2,13	2,25	2,50	3,00	4,00
1,00	1,00		1,04	1,04					1,04	1,04
0,002	0,004		0,02	0,03					1,00	2,00
1,00	1,00		1,06	1,07					2,04	3,04
									0,50	0,50
									1,00	2,00
									1,50	2,50
									0,25	0,25
									1,00	2,00
									1,25	2,25
									0,12	0,12
									1,00	2,00
									1,12	2,12
									0,06	0,06
									1,00	2,00
									1,06	2,06

Figura 26. (A): Matriz de porcentagens de inibição do crescimento da *C. krusei* na combinação da 3'-HC com fluconazol.  -Porcentagens de inibição abaixo de 80%.  -Porcentagens de inibição acima de 80% (valores em negrito/média de três experimento).  -Concentração do fluconazol em µg/mL.  -Concentração da 3'-HC em µg/mL.

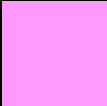
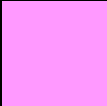
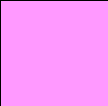
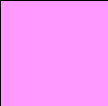
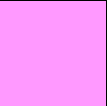
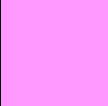
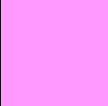
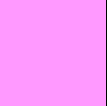
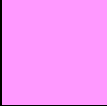
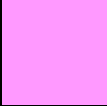
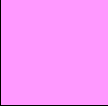
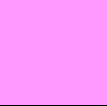
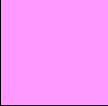
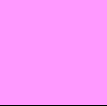
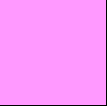
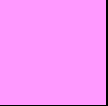
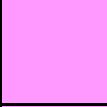
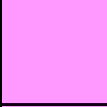
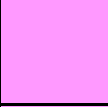
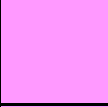
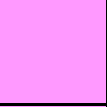
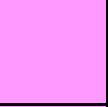
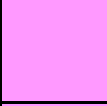
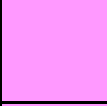
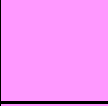
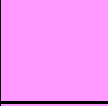
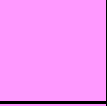
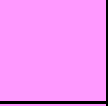
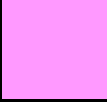
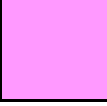
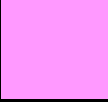
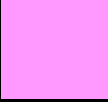
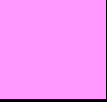
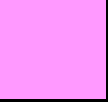
101,36	98,26	99,97	96,92	93,85	87,70	82,78	95,44	100,43	102,80	97,45
32,00	32,00	32,00	32,00	32,00	32,00	32,00	32,00	32,00	32,00	32,00
0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
								84,95	100,62	99,05
								16,00	16,00	16,00
								15,63	31,25	62,50
								86,13	98,68	100,45
								8,00	8,00	8,00
								15,63	31,25	62,50
								88,64	99,38	101,52
								4,00	4,00	4,00
								15,63	31,25	62,50
								82,29	98,54	98,62
								2,00	2,00	2,00
								15,63	31,25	62,50
								83,43	98,03	97,49
								1,00	1,00	1,00
								15,63	31,25	62,50
								82,76	100,88	97,24
								0,50	0,50	0,50
								15,63	31,25	62,50

Figura 26. (B): Interface entre crescimento “desejável” (acima de 80%) e crescimento não desejável (abaixo de 80%) para *C. krusei* na combinação da 3'-HC com fluconazol.  -Porcentagens de inibição abaixo de 80%.  -CIF do fluconazol.  -CIF da 3'-HC.  -ICIF.

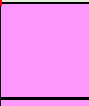
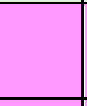
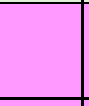
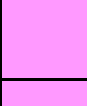
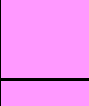
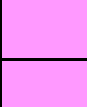
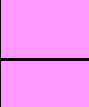
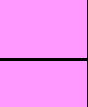
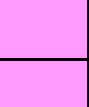
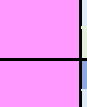
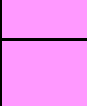
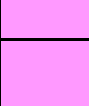
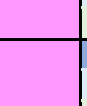
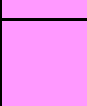
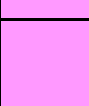
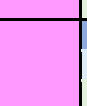
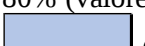
1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
0,004	0,01	0,02	0,03	0,06	0,13	0,25	0,50	1,00	2,00	4,00
1,00	1,01	1,02	1,03	1,06	1,13	1,25	1,50	2,00	3,00	5,00
								0,50	0,50	0,50
								1,00	2,00	4,00
								1,50	2,50	4,50
								0,25	0,25	0,25
								1,00	2,00	4,00
								1,25	2,25	4,25
								0,13	0,13	0,13
								1,00	2,00	4,00
								1,13	2,13	4,13
								0,06	0,06	0,06
								1,00	2,00	4,00
								1,06	2,06	4,06
								0,03	0,03	0,03
								1,00	2,00	4,00
								1,03	2,03	4,03
								0,02	0,02	0,02
								1,00	2,00	4,00
								1,02	2,02	4,02

Figura 27. (A): Matriz de porcentagens de inibição do crescimento da *C. krusei* na combinação da 3'-HC com clotrimazol.  -Porcentagens de inibição abaixo de 80%.  -Porcentagens de inibição acima de 80% (valores em negrito/média de três experimento).  -Concentração do clotrimazol em µg/mL.  -Concentração da 3'-HC em µg/mL.

98,78	101,76	100,30	100,89	98,76	101,24	101,44	99,09	101,46	99,68	96,39
0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
99,71	98,76	100,09	105,70	101,12	99,69	100,01	89,95	101,44	101,44	101,32
0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
100,20	98,01	101,23	93,81	98,11	89,14			97,59	101,13	100,94
0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13			0,13	0,13	0,13
0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95			15,63	31,25	62,50
								102,17	99,88	99,33
								0,06	0,06	0,06
								15,63	31,25	62,50
								101,86	99,13	101,34
								0,03	0,03	0,03
								15,63	31,25	62,50
								98,53	98,02	101,17
								0,02	0,02	0,02
								15,63	31,25	62,50
							81,27	101,37	101,29	102,85
							0,01	0,01	0,01	0,01
							7,81	15,63	31,25	62,50

Figura 27. (B): Interface entre crescimento “desejável” (acima de 80%) e crescimento não desejável (abaixo de 80%) para *C. krusei* na combinação da 3'-HC com clotrimazol.  -Porcentagens de inibição abaixo de 80%.  -CIF do clotrimazol.  -CIF da 3'-HC.  -ICIF.

4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
0,004	0,01	0,02	0,03	0,06	0,13	0,25	0,50	1,00	2,00	4,00
4,00	4,01	4,02	4,03	4,06	4,13	4,25	4,50	5,00	6,00	8,00
2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
0,004	0,01	0,02	0,03	0,06	0,13	0,25	0,50	1,00	2,00	4,00
2,00	2,01	2,02	2,03	2,06	2,13	2,25	2,50	3,00	4,00	6,00
1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00			1,04	1,04	1,04
0,004	0,01	0,02	0,03	0,06	0,13			1,00	2,00	4,00
1,00	1,01	1,02	1,03	1,06	1,13			2,04	3,04	5,04
								0,50	0,50	0,50
								1,00	2,00	4,00
								1,50	2,50	4,50
								0,25	0,25	0,25
								1,00	2,00	4,00
								1,25	2,25	4,25
								0,12	0,12	0,12
								1,00	2,00	4,00
								1,12	2,12	4,12
							0,06	0,06	0,06	0,06
							0,50	1,00	2,00	4,00
							0,56	1,06	2,06	4,06

Figura 28. (A): Matriz de porcentagens de inibição do crescimento da *C. krusei* na combinação da 3'-HC com 2-HC.  -Porcentagens de inibição abaixo de 80%.  -Porcentagens de inibição acima de 80% (valores em negrito/média de três experimento).  -Concentração da 3'-HC em µg/mL.  -Concentração da 2-HC em µg/mL.

92,18	95,96	99,31	99,60	92,47	97,85	99,60	100,18	99,75	103,96	94,94
31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25
0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
93,78	94,94	96,98	99,75	95,96	98,58	101,20	104,11	102,22	105,13	102,95
15,63	15,63	15,63	15,63	15,63	15,63	15,63	15,63	15,63	15,63	15,63
0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
						85,20	94,07	101,05	102,07	100,91
						7,81	7,81	7,81	7,81	7,81
						3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
							88,84	102,80	105,56	100,62
							3,91	3,91	3,91	3,91
							7,81	15,63	31,25	62,50
								94,51	97,56	101,93
								1,95	1,95	1,95
								15,63	31,25	62,50
								94,07	101,78	100,91
								0,98	0,98	0,98
								15,63	31,25	62,50
								98,73	100,91	101,49
								0,49	0,49	0,49
								15,63	31,25	62,50

Figura 28. (B): Interface entre crescimento “desejável” (acima de 80%) e crescimento não desejável (abaixo de 80%) para *C. krusei* na combinação da 3'-HC com 2-HC.  -Porcentagens de inibição abaixo de 80%.  -CIF da 3'-HC.  -CIF da 2-HC.  -ICIF.

2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
0,002	0,00	0,01	0,02	0,03	0,06	0,13	0,25	0,50	1,00	2,00
2,00	2,00	2,01	2,02	2,03	2,06	2,13	2,25	2,50	3,00	4,00
1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
0,002	0,00	0,01	0,02	0,03	0,06	0,13	0,25	0,50	1,00	2,00
1,00	1,00	1,01	1,02	1,03	1,06	1,13	1,25	1,50	2,00	3,00
						0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
						0,13	0,25	0,50	1,00	2,00
						0,63	0,75	1,00	1,50	2,50
							0,25	0,25	0,25	0,25
							0,25	0,50	1,00	2,00
							0,50	0,75	1,25	2,25
								0,12	0,12	0,12
								0,50	1,00	2,00
								0,62	1,12	2,12
								0,06	0,06	0,06
								0,50	1,00	2,00
								0,56	1,06	2,06
								0,03	0,03	0,03
								0,50	1,00	2,00
								0,53	1,03	2,03

Para determinar a interação existente entre as combinações dos princípios ativos foi utilizado o menor ICIF da interface de inibição de crescimento “desejável” e “não desejável” (método do menor ICIF). Os resultados apresentados acima estão resumidos na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados obtidos nos ensaios de avaliação da atividade *in vitro* combinatória para cada combinação testada, utilizando-se as espécies *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*.

		CIM ₈₀ FCZ (individual)	CIM ₈₀ FCZ (combinação)	CIF FCZ	CIM ₈₀ 2-HC (individual)	CIM ₈₀ 2-HC (combinação)	CIF 2- HC	ICIF
2-HC com FCZ	<i>C. albicans</i>	0,50	0,13	0,25	31,25	0,24	0,01	0,3
	<i>C. tropicalis</i>	0,50	0,50	1,00	31,25	0,06	0,002	1,0
	<i>C. krusei</i>	32,00	0,50	0,02	31,25	15,63	0,50	0,5
		CIM ₈₀ CTZ (individual)	CIM ₈₀ CTZ (combinação)	CIF CTZ	CIM ₈₀ 2-HC (individual)	CIM ₈₀ 2-HC (combinação)	CIF 2- HC	ICIF
2-HC com CTZ	<i>C. albicans</i>	0,03	0,02	0,50	31,25	0,06	0,002	0,5
	<i>C. tropicalis</i>	0,03	0,002	0,06	31,25	15,63	0,50	0,6
	<i>C. krusei</i>	0,13	0,13	1,00	31,25	0,06	0,002	1,0
		CIM ₈₀ FCZ (individual)	CIM ₈₀ FCZ (combinação)	CIF FCZ	CIM ₈₀ 3'-HC (individual)	CIM ₈₀ 3'-HC (combinação)	CIF 3'- HC	ICIF
3'-HC com FCZ	<i>C. albicans</i>	0,50	0,25	0,50	31,25	0,06	0,002	0,5
	<i>C. tropicalis</i>	0,50	0,25	0,50	62,50	0,06	0,001	0,5
	<i>C. krusei</i>	32,00	32,00	1,00	15,63	0,06	0,00	1,0
		CIM ₈₀ CTZ (individual)	CIM ₈₀ CTZ (combinação)	CIF CTZ	CIM ₈₀ 3'-HC (individual)	CIM ₈₀ 3'-HC (combinação)	CIF 3'- HC	ICIF
3'-HC com CTZ	<i>C. albicans</i>	0,03	0,002	0,06	31,25	15,63	0,50	0,6
	<i>C. tropicalis</i>	0,03	0,002	0,06	62,50	62,50	1,00	1,1
	<i>C. krusei</i>	0,13	0,01	0,06	15,63	7,81	0,50	0,6
		CIM ₈₀ 3'-HC (individual)	CIM ₈₀ 3'-HC (combinação)	CIF 3'- HC	CIM ₈₀ 2-HC (individual)	CIM ₈₀ 2-HC (combinação)	CIF 2- HC	ICIF
3'-HC com 2-HC	<i>C. albicans</i>	31,25	7,81	0,25	31,25	3,91	0,13	0,4
	<i>C. tropicalis</i>	31,25	7,81	0,25	62,50	15,63	0,25	0,5
	<i>C. krusei</i>	15,63	3,91	0,25	31,25	7,81	0,25	0,5

*2-HC: 2-hidroxichalcona; 3'-HC: 3'-hidroxichalcona; FCZ: fluconazol; CTZ: clotrimazol. CIF: Concentração Inibitória Fracionada. ICIF: Índice da Concentração Inibitória Fracionada. CIM₈₀: Concentração Inibitória Mínima 80% em µg/mL dos princípios ativos individuais e quando combinados.

A partir dos valores dos ICIFs demonstrados na Tabela 6, foi possível determinar o tipo de interação existente entre as combinações realizadas neste trabalho. A Tabela 7 mostra as combinações e as interações obtidas (SADER; HUYNH; JONES, 2003).

Tabela 7. Tipos de interações obtidas nos ensaios de atividade antifúngica combinatória nas diferentes combinações dos princípios ativos.

Combinações	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>
2-hidroxichalcona + fluconazol	Sinergismo	Aditiva	Sinergismo
2-hidroxichalcona + clotrimazol	Sinergismo	Sinergismo parcial	Aditiva
3'-hidroxichalcona + fluconazol	Sinergismo	Sinergismo	Aditiva
3'-hidroxichalcona + clotrimazol	Sinergismo parcial	Indiferente	Sinergismo parcial
2-hidroxichalcona + 3'-hidroxichalcona	Sinergismo	Sinergismo	Sinergismo

De acordo com os resultados obtidos, todas as combinações apresentaram concentrações dos princípios ativos combinados capazes de inibir no mínimo 80% do crescimento fúngico e ainda, nenhuma dessas combinações apresentaram efeito antagônico, ou seja, todas as combinações avaliadas podem ser utilizadas contra as espécies *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* e, provavelmente, estas combinações também poderiam ser utilizadas contra outras espécies do gênero *Candida*.

Mesmo diante da atividade antifúngica de todas as combinações estudadas, algumas foram consideradas mais adequadas e outras menos adequadas, de acordo com o tipo de interação existente.

Quanto às interações entre os princípios ativos que foram combinados, a combinação da 3'-HC com 2-HC apresentou os menores ICIFs, conforme descrito na Tabela 6. De acordo com a Tabela 7, essa combinação apresentou atividade sinérgica com o maior espectro de ação, em relação às outras combinações, pois foi observado efeito sinérgico contra as 3 espécies de *Candida* estudadas. Por isso, este resultado foi considerado importante e também a melhor combinação estudada. Levando em consideração a importância clínica da *C. albicans*, o aumento da incidência das espécies não-*albicans* e a resistência intrínseca destas espécies aos “azóis”, esta combinação mostrou-se promissora.

Outra combinação interessante foi da 2-HC com fluconazol e 3'-HC com fluconazol. Embora na combinação 2-HC com fluconazol para *C. tropicalis* e 3'-HC com fluconazol para *C. krusei* não foi observado efeito sinérgico, a interação entre estes os princípios ativos foram aditivas. As interações aditivas são aquelas nas quais o efeito resultante é a soma dos efeitos individuais. O sinergismo ocorre quando o efeito gerado é superior à aditividade. Sendo assim, a inibição do crescimento fúngico foi devido a somatória das atividades antifúngicas individuais da 2-HC ou 3'-HC com fluconazol. Então, a 2-HC com fluconazol e 3'-HC com fluconazol foram consideradas combinações adequadas porque também foi capaz de atuar contra as três espécies de *Candida* estudadas.

As combinações 2-HC com clotrimazol e 3'-HC com clotrimazol não apresentaram as interações mais vantajosas. A 3'-HC com clotrimazol foi a única combinação que apresentou efeito indiferente, embora a interação indiferente não signifique falta de atividade antifúngica.

Vale ressaltar que todas as combinações apresentaram efeito sinérgico/parcialmente sinérgico contra a *C. albicans*, que é o principal agente etiológico da CVV.

Sugerimos que o mecanismo de ação provável nas combinações das hidroxichalconas (apolares) com fluconazol (polar) podem apresentar atividade sinérgica por possivelmente agirem em alvos comuns, como por exemplo na passagem pela membrana e parede celular. Nestes casos, podem ocorrer abertura de poros pela repulsão de cargas causando o afastamento dos lipídios presentes nas membranas e consequentemente, aumento da permeabilidade das membranas e fluidez das moléculas polares para o interior da célula fúngica.

Por outro lado, um provável mecanismo de ação da combinação de moléculas apolares, como 2-HC com 3'-HC e estas com clotrimazol, pode ocorrer devido a combinação química por interações moleculares em alvos comuns ou separadamente em dois alvos simultâneos. Um dos anéis fenólicos das hidroxichalconas combinadas podem se projetar para o interior do citoplasma das células e causar danos significativos apresentando atividade fungicida. Então nos casos de combinações destas com fluconazol ou com clotrimazol uma das cabeças fenólicas poderiam entrar e potencializar o efeito das moléculas simultaneamente.

Além de serem utilizadas para ampliar o espectro de ação, as terapias antimicrobianas combinadas podem ser utilizadas para reduzir a concentração de fármacos com elevada toxicidade mantendo sua eficácia terapêutica. Diante disso, também foram avaliadas as reduções das CIMs dos princípios ativos combinados em relação a CIM individual de cada um e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Redução da CIM do fluconazol, clotrimazol, 2-HC e 3'-HC nas combinações para as espécies *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*.

		<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>
FCZ + 2-HC	FCZ	CIM/4	Não reduziu	CIM/64
	2-HC	CIM/130	CIM/512	CIM/2
	Interação	SIN	AD	SIN
FCZ + 3'-HC	FCZ	CIM/2	CIM/2	Não reduziu
	3'-HC	CIM/512	CIM/1024	CIM/260,4
	Interação	SIN	SIN	AD
CTZ + 2-HC	CTZ	CIM/2	CIM/16	Não reduziu
	2-HC	CIM/512	CIM/2	CIM/512
	Interação	SIN	SIN PARCIAL	AD
CTZ + 3'-HC	CTZ	CIM/16	CIM/16	CIM/16
	3'-HC	CIM/2	Não reduziu	CIM/2
	Interação	SIN PARCIAL	IND	SIN PARCIAL
2-HC + 3'-HC	2-HC	CIM/8	CIM/4	CIM/4
	3'-HC	CIM/4	CIM/4	CIM/4
	Interação	SIN	SIN	SIN

FCZ: fluconazol; CTZ: clotrimazol, 2-HC: 2-hidroxichalcona; 3'-HC: 3'-hidroxichalcona. SIN: sinergismo; SIN PARCIAL: sinergismo parcial; AD: aditiva; IND: indiferente.

A redução da CIM é uma característica das interações sinérgicas. Além de determinar o tipo de interação existente entre os princípios ativos combinados, a avaliação da redução da CIM é importante. Como já citado anteriormente, um dos objetivos de se utilizar terapias antimicrobianas combinadas consiste em reduzir os efeitos colaterais causados pelos fármacos na monoterapia. Resgatar as atividades farmacológicas de fármacos já existentes, reduzir seus efeitos colaterais e manter a eficácia terapêutica e o espectro de ação, é uma abordagem muito interessante. Por isso, a avaliação da redução das CIMs contribuiu para que sejam escolhidas as combinações que atendem estes objetivos.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 8, na combinação do fluconazol com 3'-HC e clotrimazol com 3'-HC, houve redução da CIM do fluconazol e do clotrimazol respectivamente e nas três espécies de *Candida* estudadas. Considerando que o clotrimazol é um fármaco que apresenta elevada toxicidade, a redução da CIM em 16 vezes quando combinado com a 3'-HC pode ser uma estratégia terapêutica interessante.

Para a 2-HC foram observadas reduções drásticas das CIMs quando combinadas com fluconazol ou clotrimazol nas três espécies de *Candida*. No entanto, para a 3'-HC com

fluconazol não houve redução das CIM para *C. krusei* e 3'-HC com clotrimazol não houve redução das CIM para *C. tropicalis*.

A combinação da 2-HC com 3'HC foi a única que apresentou redução das CIMs dos dois princípios ativos para as três espécies de *Candida*.

Após a avaliação das atividades antifúngicas combinatórias foram realizados ensaios de citotoxicidade das mesmas combinações.

5.2.2 Avaliação da citotoxicidade das combinações

Com o objetivo de avaliar a toxicidade das combinações propostas também foram realizados ensaios avaliação da citotoxicidade dessas combinações, utilizando-se a linhagem celular C33A. As Figuras 29, 30, 31, 32 e 33 demonstram os resultados obtidos com as combinações: 2-HC com fluconazol, 2-HC com clotrimazol, 3'-HC com fluconazol, 3'-HC com clotrimazol e 3'-HC com 2-HC, respectivamente.

Figura 29. Resultados da citotoxicidade da combinação da 2-HC com fluconazol. Valores em negrito: porcentagem de viabilidade celular (dados normalizados). (Azul): concentrações de fluconazol em µg/mL. (Verde): concentrações de 2-HC em µg/mL.

100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	98,82	98,73	100,00	94,09	39,02	0,00	0,00
4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
	0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
94,61	95,17	89,05	84,92	92,39	85,32	98,27	85,56	83,07	39,59	0,00	0,00
2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
	0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
98,82	100,00	99,26	98,67	98,37	100,00	97,29	99,14	94,53	38,32	0,00	0,00
1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
100,00	98,35	98,33	99,22	98,05	97,52	97,88	99,54	89,64	38,85	0,00	0,00
0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
100,00	100,00	99,86	88,73	89,00	96,29	99,66	96,86	81,70	39,51	0,00	0,00
0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
	0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
100,00	94,37	94,22	94,92	91,22	80,87	92,57	99,26	88,10	35,70	0,00	0,00
0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13
	0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
100,00	100,00	100,00	98,51	97,49	96,52	98,74	98,67	96,27	38,00	0,00	0,00
0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
	0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
	100,00	98,73	99,62	97,55	74,17	100,00	100,00	93,48	42,34	0,00	0,00
	0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50

Figura 30. Resultados da citotoxicidade da combinação da 2-HC com clotrimazol. Valores em negrito: porcentagem de viabilidade celular (dados normalizados). (Azul): concentrações de clotrimazol em µg/mL. (Verde): concentrações de 2-HC em µg/mL.

100,00	100,00	95,59	88,88	89,59	85,35	90,64	93,12	76,52	8,04	0,00	0,00
0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
	0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
97,19	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	11,38	0,00	0,00
0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063
	0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
85,15	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	13,53	0,00	0,00
0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031
	0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
100,00	95,04	100,00	100,00	84,32	100,00	86,22	86,22	100,00	9,71	0,00	0,00
0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016
	0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
100,00	98,38	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	16,62	0,00	0,00
0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008
	0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
100,00	98,86	91,23	100,00	100,00	92,18	99,81	93,37	100,00	20,44	0,00	0,00
0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004
	0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
100,00	100,00	88,61	100,00	86,22	85,98	88,13	100,00	100,00	15,19	0,00	0,00
0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002
	0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
	100,00	100,00	100,00	85,98	88,85	96,17	81,22	100,00	14,00	0,00	0,00
	0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50

Figura 31. Resultados da citotoxicidade da combinação da 3'-HC com fluconazol. Valores em negrito: porcentagem de viabilidade celular (dados normalizados). (Azul): concentrações de fluconazol em µg/mL. (Verde): concentrações de 3'-HC em µg/mL.

100,00	97,61	100,00	99,86	99,49	99,62	97,10	99,00	81,84	0,00	0,00	0,00
4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
	0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
100,00	100,00	100,00	99,98	98,27	99,92	97,59	96,97	93,37	0,00	0,00	0,00
2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
	0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
100,00	99,86	100,00	99,49	97,53	99,19	97,40	96,97	92,56	8,64	0,00	0,00
1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
100,00	100,00	98,13	98,33	96,36	93,94	74,12	74,00	94,90	0,00	0,00	0,00
0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
99,86	100,00	100,00	97,95	93,32	97,57	92,47	95,34	90,32	0,00	0,00	0,00
0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
	0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
100,00	100,00	100,00	97,59	96,91	98,45	97,47	96,55	90,90	0,00	0,00	0,00
0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13
	0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
99,37	100,00	100,00	99,13	99,80	99,06	77,97	81,65	97,88	0,00	0,00	0,00
0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
	0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
	100,00	100,00	99,74	100,00	99,49	98,83	97,01	85,12	0,00	0,00	0,00
	0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50

Figura 32. Resultados da citotoxicidade da combinação da 3'-HC com clotrimazol. Valores em negrito: porcentagem de viabilidade celular (dados normalizados). (Azul): concentrações de clotrimazol em µg/mL. (Verde): concentrações de 3'-HC em µg/mL.

100,00	99,50	91,73	100,00	92,36	100,00	88,41	87,95	100,00	20,30	0,00	0,00
0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
	0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
96,54	98,63	96,07	95,53	94,67	94,42	93,38	100,00	100,00	12,26	0,00	0,00
0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063
	0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
94,23	92,20	89,58	89,28	82,89	94,23	95,31	91,42	91,06	14,75	0,00	0,00
0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031
	0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
97,46	94,08	91,77	90,72	93,61	94,01	94,29	91,20	88,88	19,55	0,00	0,00
0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016
	0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
96,57	95,53	92,00	91,43	93,26	90,65	94,24	94,87	90,60	15,40	0,00	0,00
0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008
	0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
95,89	95,81	90,96	90,83	93,14	90,35	93,32	92,16	96,20	12,69	0,00	0,00
0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004
	0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
96,61	98,55	75,02	98,77	97,40	92,96	92,13	93,22	87,93	10,07	0,00	0,00
0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002
	0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
	93,80	97,84	84,95	92,37	88,39	88,13	91,15	85,40	12,12	0,00	0,00
	0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50

Figura 33. Resultados da citotoxicidade da combinação da 3'-HC com 2-HC. Valores em negrito: porcentagem de viabilidade celular (dados normalizados). (Azul): concentrações de 3'-HC em µg/mL. (Verde): concentrações de 2-HC em µg/mL.

1,99	2,54	1,81	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25
	0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
13,68	15,94	15,34	7,00	0,00	16,42	8,43	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15,63	15,625	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063
	0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
95,44	93,05	92,06	88,04	90,66	87,54	89,08	86,91	77,76	0,00	0,00	0,00
7,81	7,81	7,81	7,81	7,81	7,81	7,81	7,81	7,81	7,81	7,81	7,81
	0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
100,00	99,93	97,35	90,88	89,53	89,70	89,56	85,45	75,63	11,77	0,00	0,00
3,91	3,91	3,91	3,91	3,91	3,91	3,91	3,91	3,91	3,91	3,91	3,91
	0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
99,96	100,00	98,50	90,29	87,04	86,20	86,67	90,10	85,73	16,91	0,00	0,00
1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95
	0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
100,00	90,95	91,63	89,96	86,30	85,06	78,47	83,76	83,82	15,25	0,00	0,00
0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98
	0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	99,49	100,00	100,00	89,95	12,84	0,00	0,00
0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49
	0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50
	100,00	98,54	99,96	98,23	95,94	93,71	93,73	90,34	41,32	18,60	3,33
	0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50

Com os resultados apresentados nas Figuras 29, 30, 31, 32 e 33 foi possível verificar se as concentrações que apresentaram interações sinérgica e aditivas nos ensaios de atividade antifúngica combinatória, apresentaram também toxicidade para as células. Os resultados foram resumidos na Tabela 9.

Tabela 9. Concentrações dos fármacos combinados ($\mu\text{g/mL}$) que apresentaram os menores ICIFs nos ensaios de atividade antifúngica combinatória, as interações e as porcentagens de viabilidade celular.

		CIM ₈₀ 2-HC (combinação)	CIM ₈₀ FCZ (combinação)	Interação	% viabilidade celular (C33A)
2-HC com FCZ	<i>C. albicans</i>	0,24	0,13	SIN	94,92
	<i>C. tropicalis</i>	0,06	0,50	AD	98,35
	<i>C. krusei</i>	15,63	0,50	SIN	38,85
		CIM ₈₀ 2-HC (combinação)	CIM ₈₀ CTZ (combinação)	Interação	% viabilidade celular (C33A)
2-HC com CTZ	<i>C. albicans</i>	0,06	0,02	SIN	95,04
	<i>C. tropicalis</i>	15,63	0,002	SIN PARC	15,19
	<i>C. krusei</i>	0,06	0,13	AD	100,00
		CIM ₈₀ 3'-HC (combinação)	CIM ₈₀ FCZ (combinação)	Interação	% viabilidade celular (C33A)
3'-HC com FCZ	<i>C. albicans</i>	0,06	0,25	SIN	100,00
	<i>C. tropicalis</i>	0,06	0,25	SIN	100,00
	<i>C. krusei</i>	0,06	32,00	AD	**
		CIM ₈₀ 3'-HC (combinação)	CIM ₈₀ CTZ (combinação)	Interação	% viabilidade celular (C33A)
3'-HC com CTZ	<i>C. albicans</i>	15,63	0,002	SIN PARC	10,07
	<i>C. tropicalis</i>	62,50	0,002	IND	0,00
	<i>C. krusei</i>	7,81	0,01	SIN PARC	90,60
		CIM ₈₀ 2-HC (combinação)	CIM ₈₀ 3'-HC (combinação)	Interação	% viabilidade celular (C33A)
3'-HC com 2-HC	<i>C. albicans</i>	3,91	7,81	SIN	86,91
	<i>C. tropicalis</i>	15,63	7,81	SIN	0,00
	<i>C. krusei</i>	7,81	3,91	SIN	75,63

** Não verificado devido à faixa de concentração testada no ensaio de citotoxicidade da combinação.

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 9), as maiores porcentagens de viabilidade celular correspondem às concentrações de 2-HC ou 3'-HC abaixo de 15,63 $\mu\text{g/mL}$. A concentração de 15,63 $\mu\text{g/mL}$ está acima da CE_{50} individual destes princípios ativos sendo assim, é possível notar que a citotoxicidade das combinações é reduzida devido à redução da concentração de 2-HC ou 3'-HC. Dessa forma, foi possível encontrar concentrações com toxicidade reduzida sem diminuir a atividade antifúngica, devido a associação com outro princípio ativo e por tanto, houve aumento da toxicidade seletiva.

Vale ressaltar que além das vantagens de redução da citotoxicidade e aumento da seletividade pelas células fúngicas, as combinações também apresentam vantagens farmacotécnicas no sentido de que concentrações reduzidas de princípios ativos são mais facilmente incorporadas nas formulações.

A 2-HC com fluconazol e 2-HC com 3'-HC foram combinações selecionadas para a realização dos ensaios *in vivo* e futura incorporação no sistema lipídico desenvolvido.

5.3 Desenvolvimento do sistema lipídico (SL)

As amostras preparadas a partir da mistura de diferentes proporções das fases aquosa, oleosa, tensoativo e co-tensoativo e as suas classificações visuais, permitiram delimitar diferentes regiões no diagrama de fases. A Figura 34 mostra os sistemas obtidos e suas classificações e a Figura 35 mostra o diagrama de fases pseudoternário com as regiões delimitadas após classificação visual. Cada ponto do diagrama de fases foi preparado misturando-se as diferentes proporções das fases oleosa, aquosa e tensoativo/co-tensoativo (75:25, m/m). Cada uma das misturas foi levadas ao sonificador por 5 minutos e amplitude igual a 1. Posteriormente foram deixados em repouso por 24 horas.

Figura 34. Classificação visual dos sistemas obtidos: (A) – Sistema com baixa viscosidade e translúcido; (B) – Sistema com baixa viscosidade e opaco; (C) – Sistema com viscosidade média e translúcido; (D) – Sistema com viscosidade média e opaco; (E) – Sistema com alta viscosidade e translúcido; (F) – Sistema com alta viscosidade e opaco; (G) – Separação de fases.

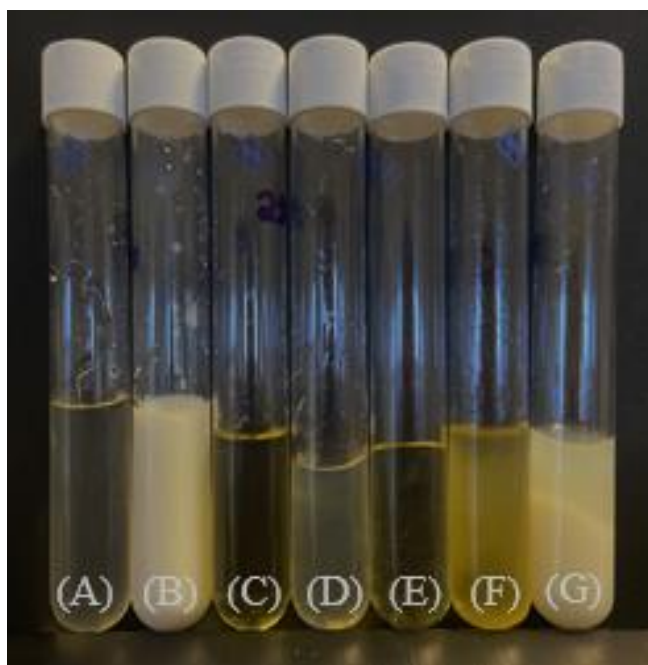
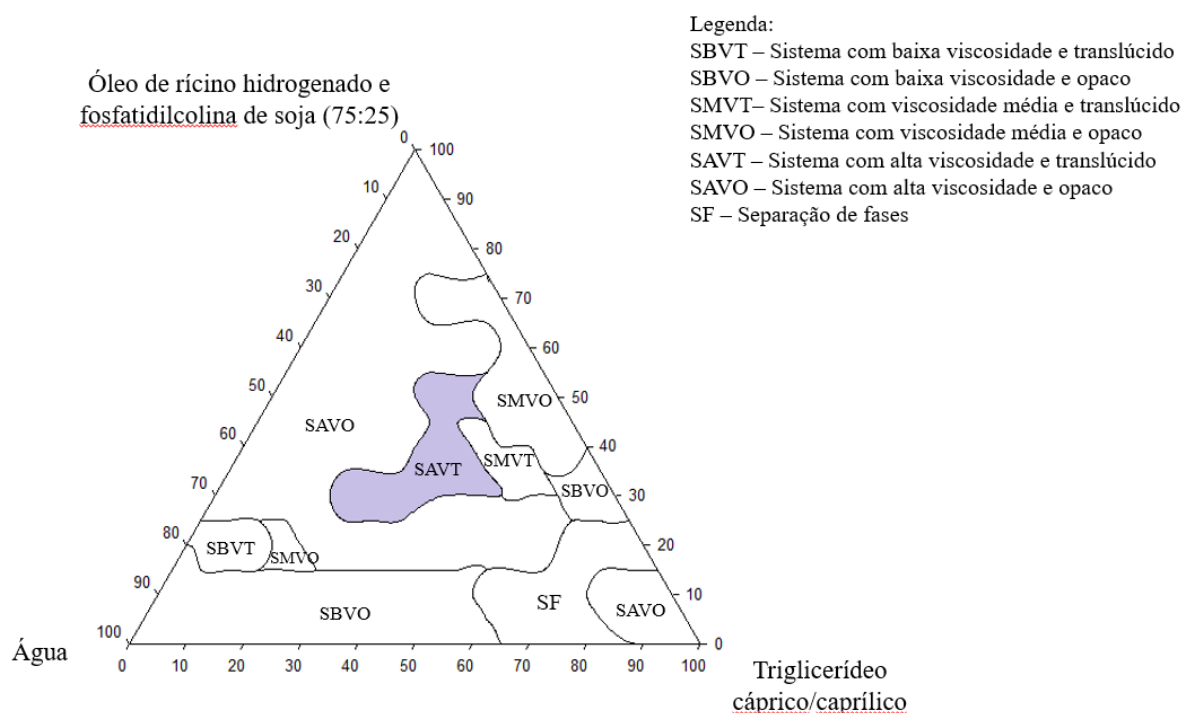


Figura 35. Diagrama de fases pseudoternário constituído por óleo de rícino hidrogenado e fosfatidilcolina de soja (tensoativo/co-tensoativo – proporção 75:25, m/m), triglicerídeo cáprico/caprílico (fase oleosa) e água e regiões formadas.



Fonte: O autor.

Foram escolhidos dois sistemas para avaliar a solubilização e veiculação dos princípios ativos. O primeiro sistema escolhido foi composto por 30% de tensoativo/co-tensoativo (75:25, m/m), 35% fase oleosa e 35% de água e foi classificado como sistema com alta viscosidade e translúcido; o segundo sistema foi composto por 30% de tensoativo/co-tensoativo (75:25, m/m), 22% fase oleosa e 48% de água e foi classificado como sistema com alta viscosidade e translúcido. A escolha dos dois sistemas foi feita considerando-se a aplicabilidade da formulação e as concentrações de fase oleosa e tensoativo/co-tensoativo, considerando que os princípios ativos utilizados neste trabalho apresentam baixa solubilidade aquosa.

Por ser uma formulação intravaginal, é necessário que o sistema apresente alta viscosidade, mantendo o princípio ativo no local de ação por mais tempo.

Foi realizado também um teste de centrifugação, submetendo-se os sistemas escolhidos a 3000 rpm por 30 minutos. Após este período as formulações mostraram-se estáveis pois não foram verificados sinais físicos de instabilidade como por exemplo, separação de fases.

5.4 Caracterização física do sistema lipídico

5.4.1 Análise do perfil de textura

A análise do perfil de textura tem como objetivo avaliar as propriedades mecânicas das formulações por meio da análise de parâmetros como: dureza, compressibilidade, adesividade e coesão.

A dureza é a força necessária para causar deformação, ou seja, demonstra o quanto a formulação é resistente à deformação. A compressibilidade é o trabalho necessário para comprimir o sistema e causar sua deformação. Adesividade é o trabalho necessário para romper as forças atrativas entre a formulação e a sonda analítica do equipamento, além disso, avalia o rompimento de ligações coesivas dentro do próprio sistema. A adesividade está diretamente relacionada à coesão da amostra.

Após a determinação destes parâmetros foram calculadas as médias e os desvios padrão. A dureza foi analisada estatisticamente utilizando-se One-way ANOVA com pós-teste de Tukey (nível de significância de 0,01%). Estes ensaios foram realizados com os dois sistemas propostos no item 5.3 e com estes sistemas contendo 0,1% de 2-HC. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Propriedades mecânicas do SL (30, 35, 35): 30% de tensoativo/co-tensoativo (75:25, m/m), 35% fase oleosa e 35% de água e deste sistema contendo 0,1% de 2-HC. Propriedades mecânicas do SL (30, 22, 48): 30% de tensoativo/co-tensoativo (75:25, m/m), 22% fase oleosa e 48% de água e deste sistema contendo 0,1% de 2-HC.

Sistemas	Dureza (N)	Compressibilidade (N.sec)	Adesividade (N.sec)	Coesão
SL (30, 35, 35)	0,93 ± 0,07 ^b	6,58 ± 0,58	5,68 ± 1,02	0,86 ± 0,03
SL (30, 35, 35) + 0,1% de 2-HC	1,60 ± 0,09 ^b	10,86 ± 0,77	7,90 ± 2,17	0,85 ± 0,03
SL (30, 22, 48)	0,62 ± 0,04 ^{a,b}	4,74 ± 0,43	4,94 ± 0,48	0,86 ± 0,01
SL (30, 22, 48) + 0,1% de 2-HC	0,71 ± 0,03 ^{a,b}	5,31 ± 0,82	4,64 ± 1,01	0,85 ± 0,07
clotrimazol 1% (creme vaginal comercial)	0,10 ± 0,01 ^b	0,86 ± 0,10	0,56 ± 0,07	0,68 ± 0,02

^a - Não tem diferença estatisticamente significativa. ^b - não tem diferença estatisticamente significativa.

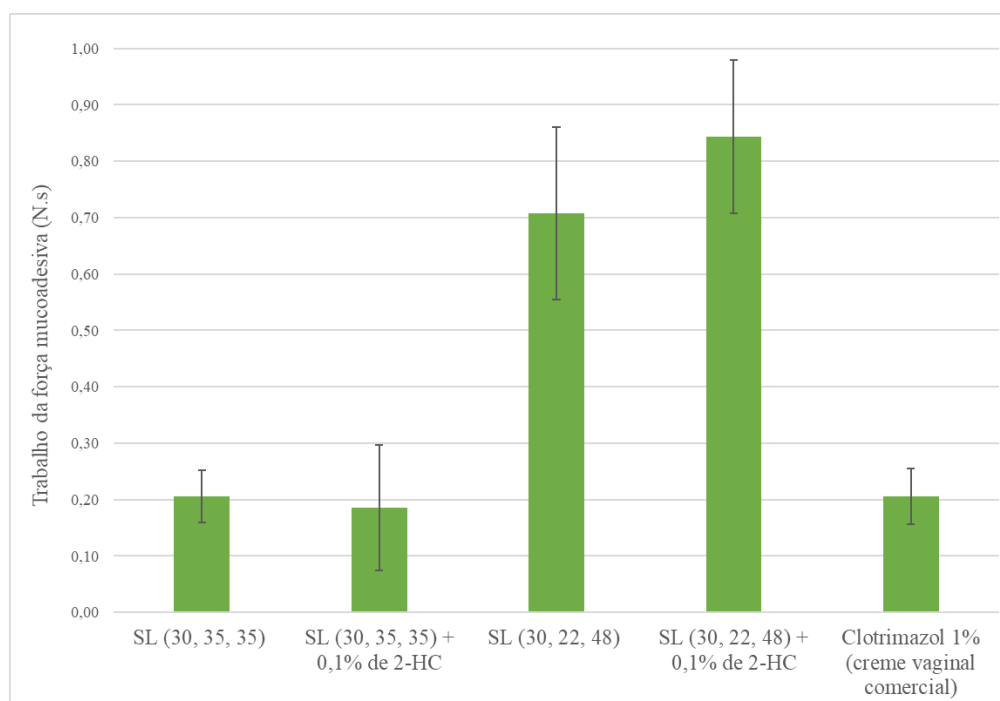
Conforme os resultados obtidos (Tabela 10), todos os sistemas apresentaram características mecânicas superiores à formulação comercial. Os valores de adesividade e coesão superiores dos sistemas em relação à formulação comercial, demonstra característica vantajosa e muito importante para aplicações intravaginais pois estas características podem aumentar o tempo de contato da formulação com a mucosa infectada, devido ao poder adesivo.

Com os resultados de dureza e compressibilidade supõe-se que as ligações existentes no interior dos sistemas são mais rígidas o que leva a um aumento da estabilidade física da formulação.

5.4.2 Determinação *in vitro* da força mucoadesiva

A força mucoadesiva também é uma característica importante em formulações para aplicação intravaginal e que pode melhorar os resultados clínicos devido ao contato prolongado da formulação com a mucosa vaginal. A Figura 36 demonstra os resultados obtidos na determinação *in vitro* da força mucoadesiva dos dois SL propostos no item 5.3 e destes sistemas contendo 0,1% de 2-HC.

Figura 36. Gráfico do trabalho da força mucoadesiva do SL (30, 35, 35): 30% de tensoativo/co-tensoativo (75:25, m/m), 35% fase oleosa e 35% de água e deste sistema contendo 0,1% de 2-HC e trabalho da força mucoadesiva do SL (30, 22, 48): 30% de tensoativo/co-tensoativo (75:25, m/m), 22% fase oleosa e 48% de água e deste sistema contendo 0,1% de 2-HC.



Conforme os resultados apresentados na Figura 36, o SL composto por 30% de tensoativo/co-tensoativo (75:25, m/m), 22% fase oleosa e 48% de água apresentou maior resistência ao destacamento dos discos de mucina em relação ao SL (30, 35, 35) e à formulação comercial. Foi possível observar também que a incorporação da 2-HC no SL (30, 22, 48) aumentou o seu poder mucoadesivo. O SL (30, 35, 35) não apresentou vantagem em relação à formulação comercial.

5.4.3 Determinação do trabalho de seringabilidade

A determinação do trabalho de seringabilidade tem o objetivo de prever o comportamento do sistema no momento da aplicação. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 11 (BERNEGOSSI et al., 2014).

Tabela 11. Trabalho de seringabilidade do SL (30, 35, 35): 30% de tensoativo/co-tensoativo (75:25, m/m), 35% fase oleosa e 35% de água e deste sistema contendo 0,1% de 2-HC e trabalho de seringabilidade do SL (30, 22, 48): 30% de tensoativo/co-tensoativo (75:25, m/m), 22% fase oleosa e 48% de água e deste sistema contendo 0,1% de 2-HC.

Sistemas	Trabalho de seringabilidade (N.sec)
SL (30, 35, 35)	77,37 ± 2,10
SL (30, 35, 35) + 0,1% de 2-HC	100,09 ± 7,49
SL (30, 22, 48)	48,96 ± 2,44
SL (30, 22, 48) + 0,1% de 2-HC	53,32 ± 0,28
clotrimazol 1% (creme vaginal comercial)	21,58 ± 3,30

Conforme os resultados da Tabela 11, os SLs apresentaram maior trabalho de seringabilidade em relação à formulação comercial, o que já era esperado pois estes sistemas possuem maior viscosidade. O SL (30, 22, 48) e SL (30, 22, 48) contendo 0,1% de 2-HC apresentou menor trabalho de seringabilidade em relação aos SL (30, 35, 35) e SL (30, 35, 35) contendo 0,1% de 2-HC; este resultado demonstra que o SL (30, 22, 48) possui maior facilidade para a aplicação intravaginal e estes resultados também serão levados em consideração na escolha do sistema mais adequado.

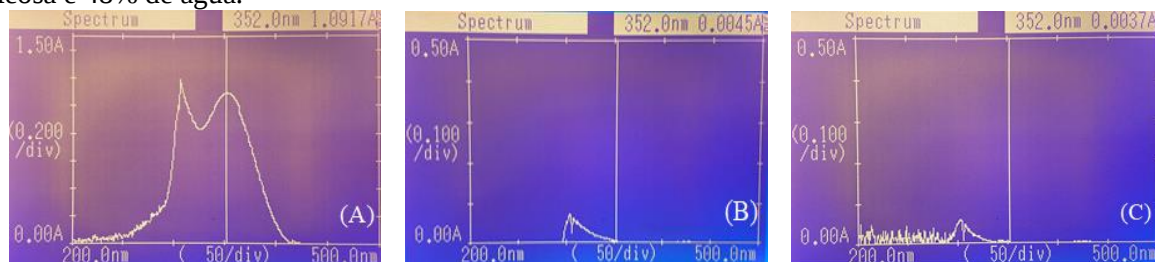
5.5 Ensaios iniciais de desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação dos princípios ativos nas formulações por espectrofotometria no UV-Visível

Inicialmente foi desenvolvido e validado o método analítico para quantificação da 2-HC nos dois sistemas escolhidos com objetivo de avaliar a capacidade destes sistemas em solubilizar e, portanto, veicular a 2-HC. Devido aos resultados obtidos com as combinações da 2-HC e 3'-HC com fluconazol e clotrimazol, e combinação das duas chalconas hidroxiladas, os ensaios de desenvolvimento e validação continuidade no futuro para que seja possível quantificar os dois princípios ativos combinados.

5.5.1 Especificidade/seletividade

A Figura 37 mostra os espectros de absorção obtidos com a solução de 2-hidroxichalcona e os sistemas desenvolvidos dissolvidos em etanol.

Figura 37. (A) Espectro de absorção da 2-hidroxichalcona. (B) Espectro de absorção do sistema composto por 30% de tensoativo/co-tensoativo (75:25, m/m), 35% fase oleosa e 35% de água. (C) Espectro de absorção do sistema composto por 30% de tensoativo/co-tensoativo (75:25, m/m), 22% fase oleosa e 48% de água.



Conforme os espectros de absorção obtidos e apresentados na Figura 37, a 2-hidroxichalcona (2-HC) apresentou dois comprimentos de onda de absorção máxima, em 308,5 nm e 352 nm. O comprimento de onda escolhido para validação do método analítico foi de 352 nm. Neste comprimento de onda, os sistemas escolhidos para veicular a 2-HC, não apresentaram interferência significativa. Sendo assim, as absorbâncias obtidas nas amostras da validação do método, devem-se apenas à absorbância do princípio ativo.

A Tabela 12 apresenta os resultados obtidos submetendo-se a 2-HC às condições de degradação oxidativa, básica, ácida e exposição à luz.

Tabela 12. Resultados do teste de estresse da 2-hidroxichalcona.

	Concentração teórica (µg/mL)	ABS	Concentração obtida (µg/mL)	% de Recuperação
Solução padrão	10,04	0,5797	-	-
Degradação oxidativa	10,00	0,5397	9,28	92,83
Degradação básica	10,00	0,1274	2,33	23,31
Degradação ácida	10,12	0,5370	9,24	91,28
Fotólise	10,08	0,3137	5,47	54,29

Conforme os resultados obtidos, as condições de degradação nas quais as amostras foram expostas influenciaram nas porcentagens de recuperação, o que pode ser observado comparando-se a absorbância da solução padrão (sem degradação) com as absorbâncias da 2-HC após as condições de degradação. Na exposição ao NaOH 0,1M, a solução contendo 2-HC apresentou coloração laranja intensa, mostrando intensa degradação, conforme foi apresentado na Tabela 12. A luz também provocou intensa degradação, conforme já era esperado pois a 2-

HC é uma molécula fotossensível. As condições de degradação ácida e oxidativa causaram a degradação da 2-HC de forma menos expressiva.

Dessa forma, seria necessária outra técnica complementar para identificação e quantificação dos produtos de degradação como por exemplo, cromatografia líquida de alta eficiência.

5.5.2 Linearidade

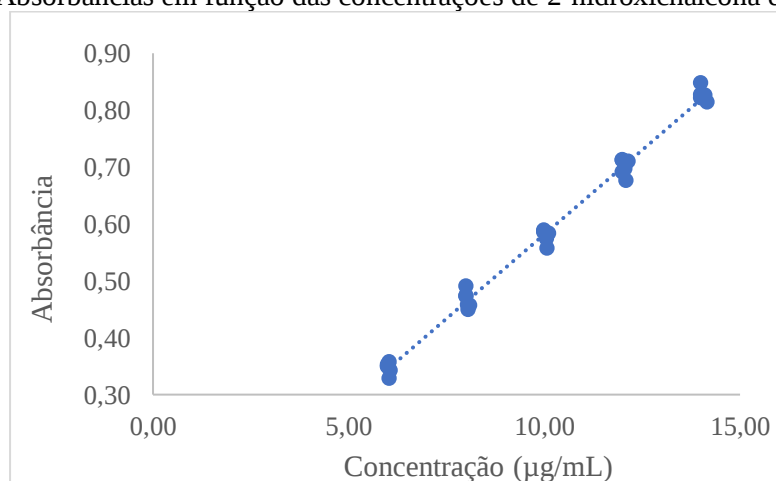
A Tabela 13 representa os resultados da linearidade obtidos com as soluções de 2-hidroxichalcona em etanol e a Figura 38 representa as absorbâncias em função das concentrações.

Tabela 13. Resultados da linearidade obtidos com as soluções de 2-hidroxichalcona em etanol.

Concentração (µg/mL)*	Absorbância*	FR*	DP*	DPR*	Média geral (FR)	DP geral (FR)	DPR geral (FR)
6,03	0,3474	0,057647	0,0019	3,28	0,05809	0,0015	2,52
8,03	0,4657	0,057968	0,0017	3,06			
10,04	0,5797	0,057724	0,0014	2,37			
12,05	0,7003	0,058108	0,0013	2,27			
14,06	0,8266	0,058789	0,0010	1,78			

*média de sete valores; FR – fator resposta; DP – desvio padrão; DPR – desvio padrão relativo.

Figura 38. Absorbâncias em função das concentrações de 2-hidroxichalcona em etanol.



A análise visual dos pontos é a etapa inicial para a avaliação da linearidade do método e, de acordo com a Figura 38 as absorbâncias em função das concentrações de 2-hidroxichalcona

apresentam relação linear aparente.

O método recomendado pela ANVISA, para estimar a equação da reta, é o método dos mínimos quadrados, que pode ser método dos mínimos quadrados ponderados ou método dos mínimos quadrados ordinários (ANVISA, 2017).

Se a variância de y for constante, os dados são homocedásticos, então utiliza-se o método dos mínimos quadrados ordinários para obtenção da equação da reta. Quando se observa heterocedasticidade é recomendável utilizar o método dos mínimos quadrados ponderados.

Dessa forma, após a análise visual, foi avaliada a variância dos resultados de y para cada valor de x, com o objetivo de definir o método a ser utilizado para obtenção da equação da reta.

A Tabela 14 mostra as variâncias de y para cada x (concentração em µg/mL).

Tabela 14. Variâncias de y (absorbâncias) para cada concentração.

Concentração (µg/mL)	Variâncias
6,0	0,000109
8,0	0,000147
10,0	0,000144
12,0	0,000216
14,0	0,000138
Soma	0,000754

A avaliação da homocedasticidade ou heterocedasticidade foi feita por meio da aplicação do teste de Cochran. Neste teste, a hipótese nula (H_0) é que as variâncias sejam todas iguais (homocedasticidade) e a hipótese alternativa (H_1) é que pelo menos uma das variâncias seja diferente das outras (heterocedasticidade) (ANVISA, 2017).

O valor de $C_{\text{calculado}}$ foi obtido somando-se as variâncias de y (Tabela 14) e dividindo-se pela maior variância obtida, conforme a Equação 10. A Tabela 15 mostra os resultados obtidos no teste de Cochran.

$$C_{\text{calculado}} = \frac{\text{maior variância em y}}{\text{soma de todas as variâncias em y}}$$

Equação 10

Tabela 15. Resultados do teste de Cochran.

Teste de Cochran	
C calculado	0,2868
C tabelado	0,5065

Conforme pode ser observado na Tabela 15, o $C_{\text{calculado}}$ é menor que C_{tabelado} ao nível de significância de 5%, por isso aceita-se a hipótese nula e conclui-se que os dados são homocedásticos. A partir disto, foi utilizado o método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) para obtenção da equação da reta. A Figura 39 mostra a curva analítica obtida, a equação da reta e o coeficiente de determinação. A Tabela 16 mostra a estatística de regressão.

Figura 39. Curva analítica (absorbâncias em função das concentrações de 2-hidroxichalcona em etanol); equação da reta e coeficiente de determinação.

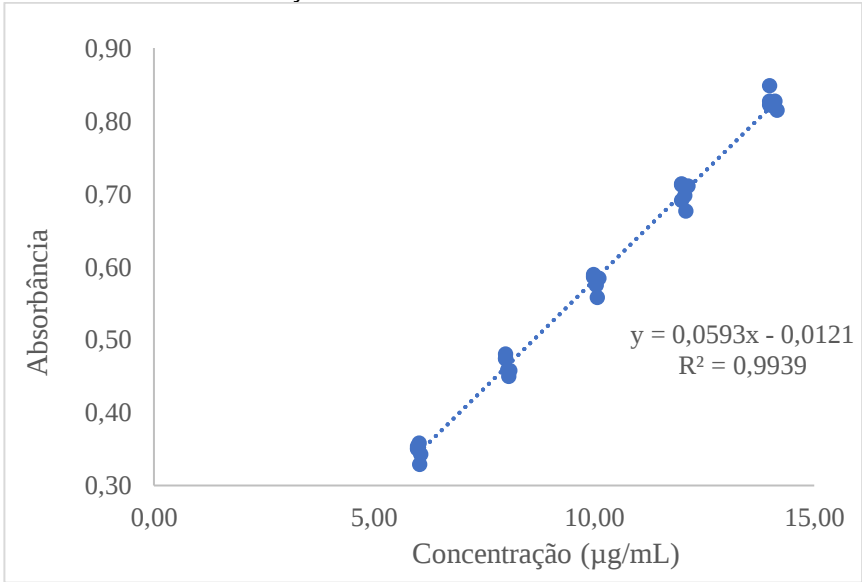


Tabela 16. Estatística de regressão.

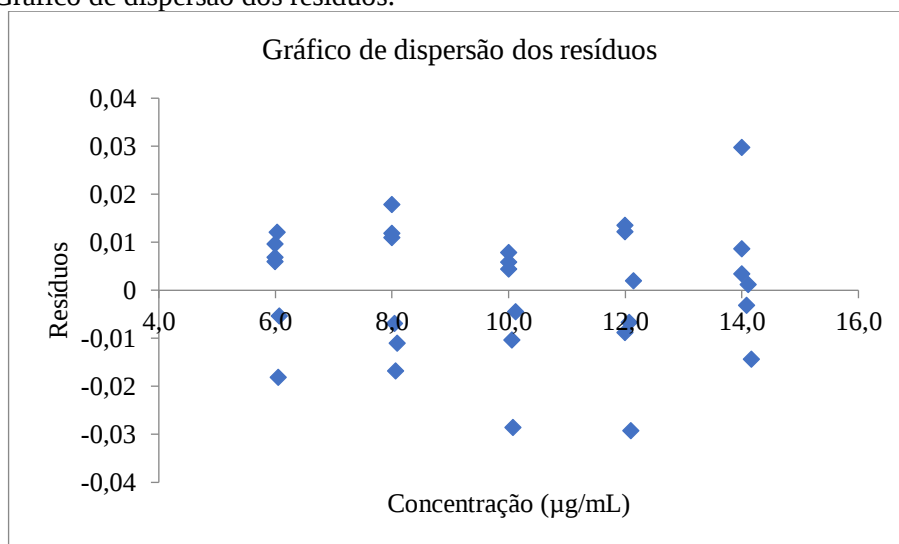
Estatística de regressão	
R múltiplo	0,996923
R-Quadrado	0,993856
R-quadrado ajustado	0,993636
Erro padrão	0,013722
Observações	30

O coeficiente de correlação de Pearson obtido foi de 0,99692 e o coeficiente de determinação foi de 0,99386. O coeficiente de correlação de Pearson (ρ) mede o grau de dependência linear de uma variável explicativa e a variável resposta. Valores de $\rho=1$ indicam correlação perfeita e positiva entre as duas variáveis. Portanto, de acordo com os resultados obtidos, existe forte correlação linear entre x e y.

O critério mínimo aceitável para o coeficiente de correlação é de 0,990, conforme estabelecido pela ANVISA, então, o coeficiente de correlação obtido neste trabalho, atende à especificação da ANVISA (BRASIL, 2017; DUARTE, 2019).

A Figura 40 mostra o gráfico de dispersão dos resíduos. A análise deste gráfico também é importante para verificar a homocedasticidade, termo utilizado para designar que a variância dos erros experimentais é constante. Uma curva bem ajustada deverá apresentar erros com distribuição uniforme, média zero e variância constante.

Figura 40. Gráfico de dispersão dos resíduos.



Conforme observado na Figura 40, é possível observar um comportamento aleatório e constante em torno de zero (variância constante) então, conclui-se que a variância dos resíduos é homocedástica e, portanto, o modelo é satisfatório.

A regressão linear só pode ser utilizada se os erros apresentarem distribuição normal, caso contrário, o modelo deve ser modificado para que os erros se comportem como uma variável normal. Para verificar a normalidade dos erros são utilizados testes de normalidade, que possuem o objetivo de determinar se um conjunto de dados apresenta distribuição normal.

Para verificar a normalidade dos resíduos da regressão linear foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk, no qual a hipótese nula (H_0) foi: a amostra provém de uma população normal e a hipótese alternativa (H_1) foi: a amostra não provém de uma população normal, ao nível de significância de 5%. A Tabela 17, mostra o valor calculado e tabelado obtidos no teste de Shapiro-Wilk.

Tabela 17. Resultados do teste de Shapiro-Wilk.

Teste de Shapiro-Wilk	
$W_{\text{calculado}}$	1,057
W_{tabelado}	0,927

Conforme pode ser observado na Tabela 17, $W_{\text{calculado}}$ é maior que W_{tabelado} e por isso, não há evidências para rejeitar a hipótese nula, e os dados são, pelo menos aproximadamente similares a distribuição normal.

5.5.2.1 Avaliação dos coeficientes

De acordo com a RCD 166/2017 (ANVISA, 2017), o coeficiente angular deve ser significativamente diferente de zero. Para isso, foi utilizado o teste F da ANOVA e foram testadas as hipóteses: H_0 : coeficiente angular igual a zero e H_1 : coeficiente angular diferente de zero. Os resultados encontram-se na Tabela 18.

Tabela 18. Avaliação da significância do coeficiente angular (ANOVA). Nível de significância de 5%.

ANOVA					
	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	0,852759	0,852759	4529,191	$1,64 \times 10^{-32}$
Resíduo	28	0,005272	0,000188		
Total	29	0,858031			

Conforme os resultados na Tabela 18, o P-valor ($1,64 \times 10^{-32}$) do teste F da ANOVA é menor que 0,05. Além disso, o $F_{\text{calculado}} = 4529,191$ é maior que 4,20 (F_{tabelado}) então, rejeita-se a hipótese nula e considera-se o coeficiente angular diferente de zero, ao nível de significância de 5%.

Para a avaliação da significância do coeficiente linear (intercepto) foi utilizado o teste t de Student e foram testadas as seguintes hipóteses: H_0 : intercepto igual a zero e H_1 : intercepto diferente de zero. Os resultados encontram-se na Tabela 19.

Tabela 19. Avaliação da significância do coeficiente linear (ANOVA).

	Coeficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P
Interseção	-0,01208	0,009203	-1,31222	0,200101

Conforme os resultados obtidos na Tabela 19, o P-valor (0,200101) do teste t é maior que 0,05. Além disso, $T_{\text{calculado}} = -1,31222$ é menor que $T_{\text{tabelado}} = 2,048$, dessa forma, aceita-se a hipótese nula e conclui-se que o intercepto é considerado igual a zero ao nível de significância de 5%.

Uma função é considerada linear se o coeficiente angular for significativamente diferente de zero e o coeficiente linear for significativamente igual a zero, conforme os resultados obtidos neste trabalho.

De modo geral, os resultados obtidos na avaliação da linearidade do método analítico foram satisfatórios e atenderam às exigências da ANVISA (2017).

5.5.3 Precisão

A concordância entre os resultados foi avaliada em dois níveis: repetibilidade e precisão intermediária, para isso, foram preparadas soluções independentes de 2-hidroxichalcona em etanol nas concentrações de 8,0 µg/mL, 10,0 µg/mL e 12,0 µg/mL. Cada concentração foi preparada em triplicata.

5.5.3.1 Precisão por repetibilidade

A Tabela 20 apresenta os resultados obtidos na precisão por repetibilidade.

Tabela 20. Resultados obtidos na avaliação da precisão por repetibilidade.

Precisão por repetibilidade								
Concentração prática (µg/mL)	ABS	Concentração obtida (µg/mL)	Concentração média* (µg/mL)	DPR	% de recuperação	Média	DP	DPR
8,00	0,4805	8,31			103,84			
8,00	0,4745	8,21	8,15	2,34	102,57			
8,05	0,4586	7,94			98,63			
10,00	0,5892	10,14			101,40			
10,00	0,5872	10,11	10,05	1,34	101,06	100,97	1,89	1,87
10,06	0,5745	9,89			98,33			
12,00	0,7122	12,21			101,78			
12,00	0,7136	12,24	12,14	1,23	101,98			
12,07	0,6976	11,97			99,14			

*média dos 3 valores; DP – desvio padrão; DPR –desvio padrão relativo: menor que 5%.

Na precisão por repetibilidade, foram calculadas a média, desvio padrão e desvio padrão relativo das porcentagens de recuperação, obtidas com as nove determinações. O desvio padrão relativo entre as análises realizadas no mesmo dia, conforme apresentado na Tabela 20, apresentou valor de 1,87% e portanto, é inferior a 5%, que foi o critério de aceitação adotado para a precisão por repetibilidade conforme AOAC (2016).

5.5.3.2 Precisão intermediária

A Tabela 21 apresenta os resultados obtidos na precisão intermediária, utilizando também nove soluções independentes de 2-hidroxichalcona em etanol nas concentrações de 8,0 µg/mL, 10,0 µg/mL e 12,0 µg/mL, posteriormente, foi calculado o desvio padrão relativo entre todas as porcentagens de recuperação obtidas.

Tabela 21. Resultados obtidos na análise da precisão intermediária com soluções independentes de 2-hidroxichalcona em etanol, feitas em dias diferentes.

Precisão intermediária								
Concentração final prática (µg/mL)	ABS	Concentração obtida (µg/mL)	Concentração média* (µg/mL)	DPR	% de recuperação	Média	DP	DPR
8,00	0,4805	8,31			103,84			
8,00	0,4745	8,21			102,57			
8,05	0,4586	7,94	8,06	2,54	98,63			
8,1	0,4573	7,92			97,77			
8,0	0,4736	8,19			102,38			
8,1	0,4497	7,79			96,57			
10,00	0,5892	10,14			101,40			
10,00	0,5872	10,11			101,06			
10,06	0,5745	9,89	9,98	2,03	98,33	99,78	2,42	2,42
10,1	0,5840	10,05			99,33			
10,0	0,5858	10,08			100,83			
10,1	0,5575	9,61			95,29			
12,00	0,7122	12,21			101,78			
12,00	0,7136	12,24			101,98			
12,07	0,6976	11,97	12,01	2,06	99,14			
12,1	0,7106	12,19			100,36			
12,0	0,6912	11,86			98,83			
12,1	0,6765	11,61			96,00			

*média dos 6 valores; DP – desvio padrão, DPR – Desvio padrão relativo: menor que 5%.

Conforme mostra a Tabela 21, a concordância entre as porcentagens de recuperação obtidas com as 18 determinações, preparadas e analisadas em dias diferentes foi de 2,42% e portanto, atende ao critério de aceitação de no máximo 5% (AOAC, 2016).

5.5.4 Exatidão

As Tabelas 22 e 23 apresentam os resultados encontrados na avaliação da exatidão do método analítico. Para avaliar este parâmetro, a 2-hidroxichalcona foi incorporada nos dois sistemas escolhidos na concentração de 0,1%.

Foi pesado 1,0 g de formulação contendo 0,1% de 2-hidroxichalcona em um balão volumétrico de 10 mL utilizando etanol como diluente. As amostras foram diluídas resultando nas concentrações baixa, média e alta ou seja, nos valores aproximados de 8,0 µg/mL, 10,0 µg/mL e 12,0 µg/mL, contemplando toda faixa linear de trabalho. As porcentagens de recuperação do princípio ativo nas formulações foram calculadas relacionando-se a concentração obtida (utilizando a equação da reta da curva analítica) com a concentração teórica

(Equação 6).

Tabela 22. Valores obtidos no ensaio de exatidão utilizando o sistema composto por 30% de tensoativo/co-tensoativo (75:25, m/m), 35% fase oleosa e 35% de água com 0,1% de 2-hidroxichalcona.

Exatidão									
Concentração final prática (µg/mL)	ABS	Concentração obtida (µg/mL)	% Recuperação	Média*	DP	DPR	Média	DP	DPR
8,4	0,4912	8,49	101,04						
8,4	0,4987	8,61	102,55	101,60	0,83	0,81			
8,4	0,4920	8,50	101,20						
10,5	0,6003	10,33	98,35						
10,5	0,5931	10,21	97,20	97,83	0,59	0,60	99,29	1,87	1,89
10,5	0,5978	10,28	97,95						
12,6	0,7158	12,27	97,42						
12,6	0,7278	12,48	99,03	98,44	0,89	0,90			
12,6	0,7267	12,46	98,88						

*Média de 3 valores; DP – desvio padrão, DPR – Desvio padrão relativo.

Tabela 23. Valores obtidos no ensaio de exatidão utilizando o sistema composto por 30% de tensoativo/co-tensoativo (75:25, m/m), 22% fase oleosa e 48% de água com 0,1% de 2-hidroxichalcona.

Exatidão									
Concentração final prática (µg/mL)	ABS	Concentração obtida (µg/mL)	% Recuperação	Média*	DP	DPR	Média	DP	DPR
8,21	0,4944	8,54	104,04						
8,21	0,4897	8,46	103,07	103,60	0,49	0,47			
8,21	0,4928	8,51	103,71						
10,26	0,6047	10,40	101,38						
10,26	0,6086	10,47	102,02	101,44	0,55	0,54	101,99	1,28	1,26
10,26	0,6020	10,36	100,93						
12,31	0,7250	12,43	100,97						
12,31	0,7244	12,42	100,89	100,92	0,04	0,04			
12,31	0,7245	12,42	100,91						

*Média de 3 valores; DP – desvio padrão, DPR – Desvio padrão relativo.

Uma das formas de se avaliar a exatidão do método analítico é pela análise de amostras nas quais uma quantidade conhecida de fármaco é adicionada à formulação ou à mistura dos componentes do medicamento, conforme feito neste trabalho.

De acordo com os resultados apresentados nas Tabelas 22 e 23, todas as amostras apresentaram-se dentro do critério de aceitação de porcentagem de recuperação entre 95% a

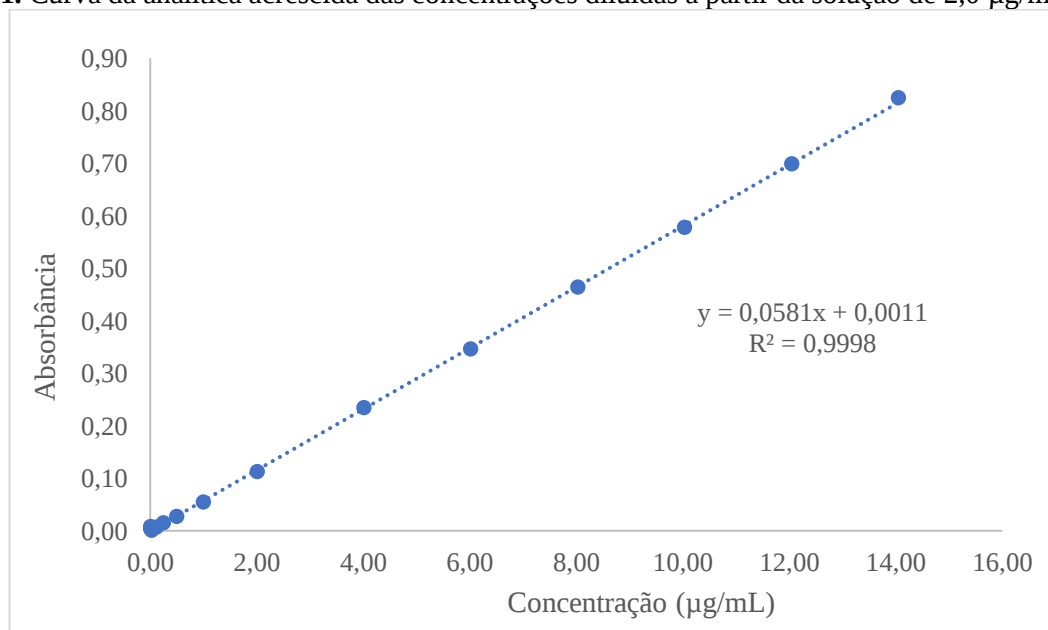
105%. Para o sistema composto por 30% de tensoativo/co-tensoativo (75:25, m/m), 35% fase oleosa e 35% de água com 0,1% de 2-hidroxichalcona, o desvio padrão relativo foi de 1,89% e para o sistema composto por 30% de tensoativo/co-tensoativo (75:25, m/m), 22% fase oleosa e 48% de água com 0,1% de 2-hidroxichalcona, o desvio padrão relativo foi de 1,26%.

Portanto, as avaliações da exatidão do método analítico, utilizando as duas formulações, atenderam ao critério de aceitação de desvio padrão relativo de no máximo 5% (AOAC, 2016; ANVISA, 2017).

5.5.5 Limite de detecção e quantificação

O limite de quantificação foi obtido de modo experimental, realizando-se a leitura de soluções diluídas a partir da solução de 2-hidroxichalcona a 2,0 µg/mL. A Figura 41, representa a curva analítica acrescida das concentrações de 1,01 µg/mL; 0,5 µg/mL, 0,25 µg/mL, 0,13 µg/mL, 0,06 µg/mL, 0,03 µg/mL, 0,02 µg/mL e 0,01 µg/mL.

Figura 41. Curva da analítica acrescida das concentrações diluídas a partir da solução de 2,0 µg/mL.



Observa-se que o coeficiente de correlação (R^2) da curva obtida foi acima de 0,990 (ANVISA, 2017). A concentração de 0,25 µg/mL foi considerada como o limite de quantificação pois abaixo desta concentração a resposta (absorbância) foi instável e os desvios obtidos com diversas leituras de amostras a 0,13 µg/mL foram muito altos. Foram preparadas novas amostras na concentração de 0,25 µg/mL e a porcentagem de recuperação e o desvio padrão relativo obtido nestas determinações foram de 102,2% e 0,39% ou seja, foi verificado

precisão e exatidão aceitáveis. A menor concentração detectável foi 0,008 µg/mL, abaixo desta concentração as absorvâncias assumiam valores negativos, então esta concentração foi considerada como limite de detecção.

5.5.6 Robustez

A Tabela 24, apresenta as porcentagens de recuperação obtidas com uma amostra nas condições nominais de análise (amostra 1) ou seja, condições normais do método analítico e com 6 amostras combinando-se diferentes variações. A Tabela 25, apresenta o resultado da avaliação de cada uma das variáveis, conforme proposto por Youden e Steiner (1975).

Tabela 24. Resultados obtidos nas condições nominais (amostra 1) e amostras com variações pré-determinadas.

Variável	Condições						
	1	2	3	4	5	6	7
A,a	A	A	A	A	a	a	a
B,b	B	B	b	b	B	B	b
C,c	C	c	C	c	C	c	C
D,d	D	D	d	d	d	d	D
E,e	E	e	E	e	e	E	e
F,f	F	f	f	F	F	f	f
	s	t	u	v	w	x	y
Concentração prática (µg/mL)	10,00	10,00	10,06	9,98	9,98	10,00	10,02
ABS	0,5729	0,2307	0,2462	0,551	0,5525	0,2457	0,2465
Concentração obtida (µg/mL)	9,87	4,09	4,36	9,50	9,52	4,35	4,36
% de recuperação	98,65	40,94	43,30	95,15	95,40	43,47	43,52

Tabela 25. Grau de influência das variações.

Efeito	Módulo
A/a (balança)	8,72
B/b (marca do etanol)	8,96
C/c (espectrofotômetro)	10,36
D/d (método de dissolução)	8,29
E/e (comprimento de onda)	6,95
F/f (material da cubeta)	53,59

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 25, a cubeta de plástico foi o fator que mais influenciou na porcentagem de recuperação das amostras, devendo-se sempre utilizar cubeta de quartzo, conforme estabelecido no método analítico. A variação do comprimento de onda, foi o fator que menos influenciou nas análises das amostras (BURIN et al., 2008).

5.5.7 Eficiência de encapsulamento

A Tabela 26, apresenta os resultados obtidos no ensaio de eficiência de encapsulamento da 2-hidroxichalcona nos sistemas desenvolvidos.

Tabela 26. Eficiência de encapsulamento.

Amostras*	Concentração final (µg/mL)	ABS	Concentração obtida (µg/mL)	% de incorporação
1	10,76	0,5775	9,94	92,40
2	10,76	0,5721	9,85	91,56
3	10,75	0,5930	10,20	94,92
4	10,77	0,6497	11,16	103,62
5	11,31	0,6903	11,84	104,73
6	13,30	0,8119	13,90	104,48

*Amostras 1, 2 e 3 - sistema composto por 30% de tensoativo/co-tensoativo (75:25, m/m), 35% fase oleosa e 35% de água com 2% de 2-hidroxichalcona. Amostras 4, 5 e 6 - sistema composto por 30% de tensoativo/co-tensoativo (75:25, m/m), 22% fase oleosa e 48% de água com 2% de 2-hidroxichalcona.

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 26), os dois sistemas foram capazes de incorporar a 2-hidroxichalcona, apresentando resultados acima de 90%. Porém o sistema composto por 30% de tensoativo/co-tensoativo (75:25, m/m), 22% fase oleosa e 48% de água com 2% de 2-hidroxichalcona apresentou maior capacidade de solubilização e veiculação do princípio ativo.

5.6 Ensaios *in vivo* com *Galleria mellonella*

5.6.1 Avaliação da segurança toxicológica e eficácia terapêutica dos compostos bioativos e suas associações e dos sistemas lipídicos

De acordo com os resultados obtidos nos ensaios de prospecção da atividade antifúngica e citotoxicidade *in vitro* das hidroxichalconas sozinhas e associadas, as combinações da 2-hidroxichalcona com 3'-hidroxichalcona e 2-hidroxichalcona com fluconazol foram consideradas as mais promissoras já que apresentaram interações sinérgicas, parcialmente sinérgicas e aditivas contra a *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. Dessa forma, estas associações foram utilizadas nos ensaios de avaliação da toxicidade e eficácia terapêutica *in vivo* em modelo animal alternativo de *G. mellonella*.

A partir das concentrações correspondentes aos menores ICIFs e que apresentaram elevada viabilidade, foram estabelecidas as dosagens a serem administradas nas larvas além disso, a solubilidade dos princípios ativos em tampão fosfato-salino também foi levada em

consideração. Na Tabela 27 constam as doses utilizadas nos ensaios *in vivo* e nas Figuras 42, 43 e 44 estão apresentadas as curvas de sobrevivência obtidas.

Tabela 27. Doses administradas nas larvas para avaliação da toxicidade *in vivo* (modelo *G. mellonella*).

	Conc. de 2-HC + Conc. de FCZ ($\mu\text{g/mL}$)		Conc. de 2-HC + Conc. de 3'-HC ($\mu\text{g/mL}$)
2-HC + FCZ	0,24 + 0,13	2-HC + 3'-HC	3,91 + 7,81
x 100	24,40 + 12,50	x 10	39,10 + 78,10
x 200	48,80 + 25,00	x 20	78,20 + 156,20
x 400	97,60 + 50,00	x 30	117,30 + 234,30

Figura 42. Curva de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* após aplicação de diferentes concentrações da combinação da 2-HC com 3'-HC.

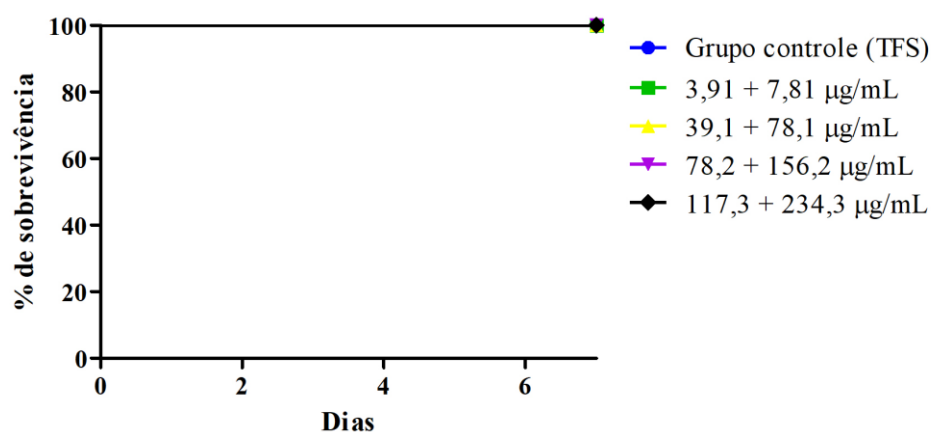


Figura 43. Curva de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* após aplicação de diferentes concentrações da combinação da 2-HC com FCZ.

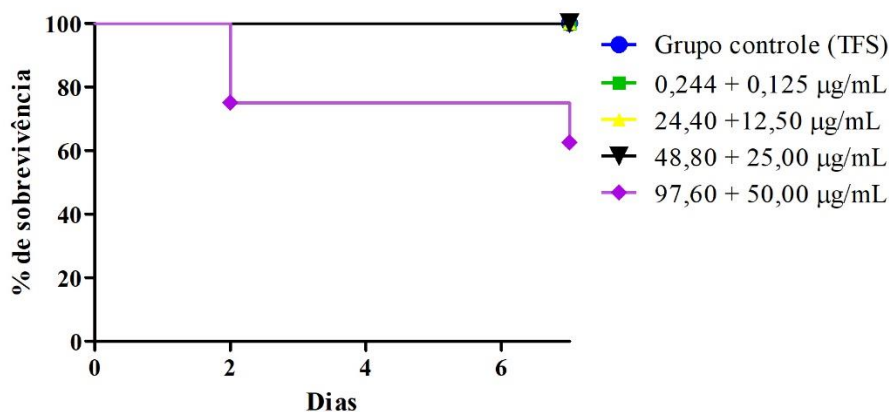
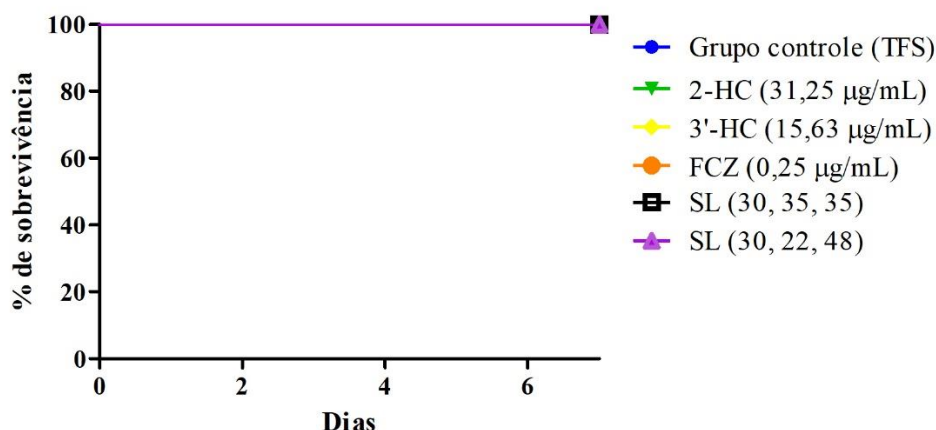


Figura 44. Curva de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* após aplicação das hidroxichalconas sozinhas (nas concentrações correspondentes à CIM) e dos sistemas lipídicos desenvolvidos.



De acordo com os resultados obtidos (Figuras 42, 43 e 44), as concentrações testadas da combinação da 2-HC com 3'-HC não apresentaram diferença em relação ao grupo de larvas que receberam injeção de tampão fosfato-salino (grupo controle), o que demonstrou ausência toxicidade *in vivo* destas concentrações. Para a combinação da 2-HC com FCZ, somente a concentração mais alta causou diminuição na sobrevivência das larvas quando comparado ao grupo controle. Por fim, os princípios ativos individuais e os SLs desenvolvidos, também não apresentaram toxicidade pois também não houve diferença em relação ao grupo controle.

Os índices de saúde das larvas no decorrer dos 7 dias foram utilizados para a construção da curva de morbidade, apresentadas nas Figuras 45, 46 e 47.

Figura 45. Curva de morbidade das larvas após administração de diferentes concentrações da combinação da 2-HC com 3'-HC durante 7 dias.

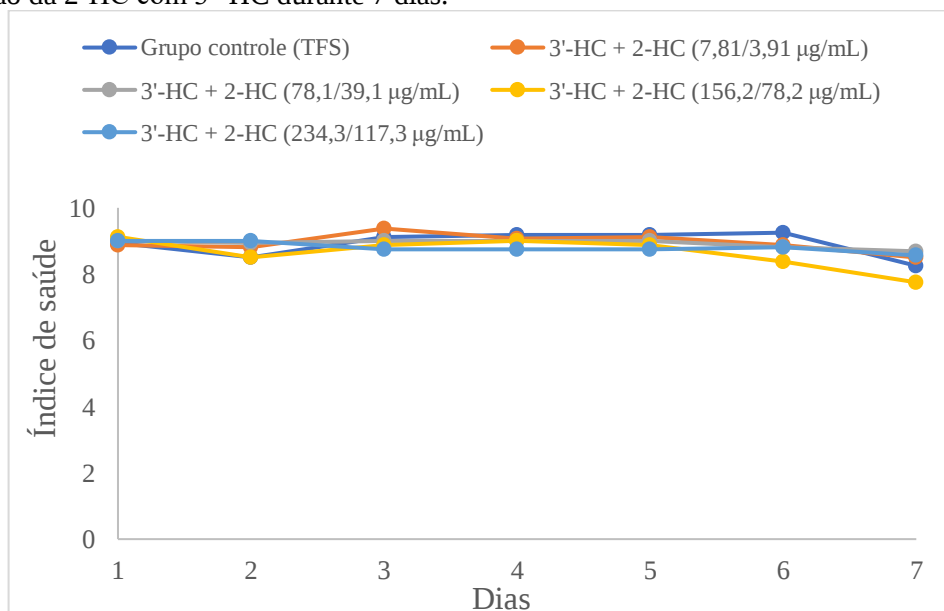


Figura 46. Curva de morbidade das larvas após administração de diferentes concentrações da combinação da 2-HC com FCZ durante 7 dias.

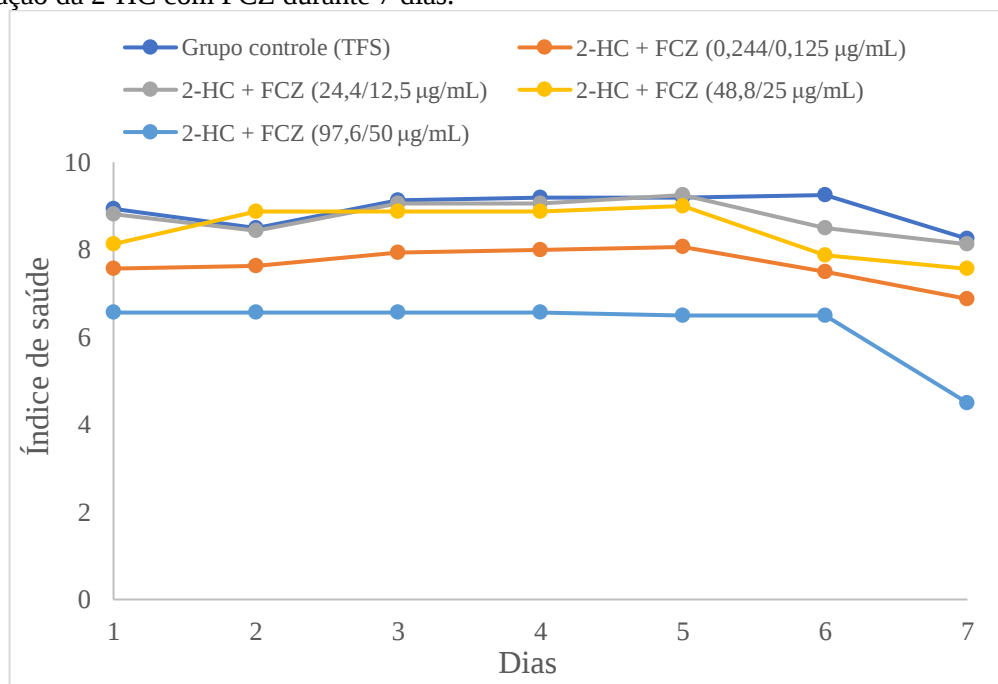
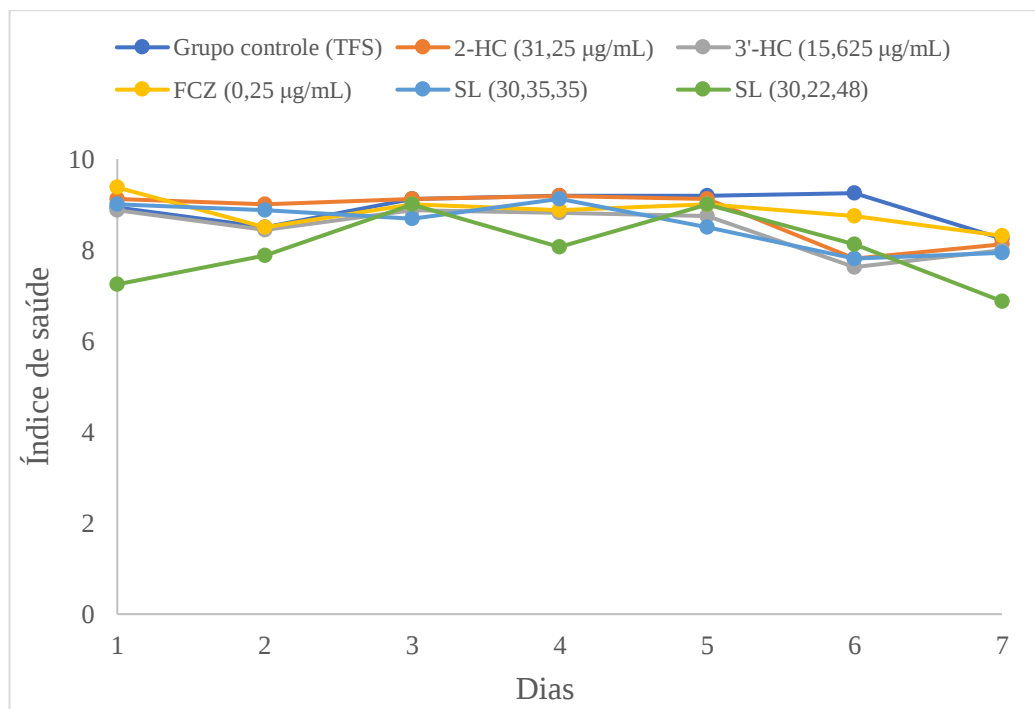


Figura 47. Curva de morbidade das larvas após administração dos princípios ativos individuais e dos sistemas lipídicos durante 7 dias.



Conforme demonstrado na Figura 42 e 45, nenhuma das concentrações testadas da combinação da 2-HC com 3'-HC alterou de forma significativa o índice de saúde das larvas ao longo do período analisado. No entanto, para a 2-HC com FCZ (Figura 43 e 46), a maior

concentração testada reduziu o índice de saúde, o que já era esperado pois esta concentração também reduziu a sobrevivência das larvas. Os princípios ativos individuais e os SL desenvolvidos não causaram diminuição na sobrevivência nem no índice de saúde das larvas durante o período analisado (Figura 44 e 47).

Os ensaios para avaliação da eficácia terapêutica foram conduzidos com as combinações de 2-HC com 3'-HC (117,3 + 234,3 µg/mL) e 2-HC com FCZ (97,6 + 50,0 µg/mL). Na Figura 48 está apresentada a curva de sobrevivência obtida após inoculação das larvas com *C. albicans* e administração dos tratamentos. Na Figura 49 constam os índices de saúde das larvas no 2º, 4º e 6º dias de experimento.

Figura 48. Curva de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* após inoculação de *C. albicans* e aplicação dos tratamentos.

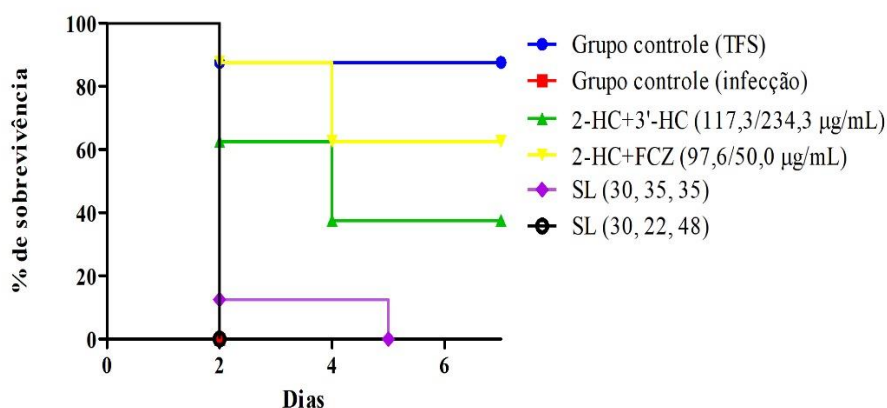
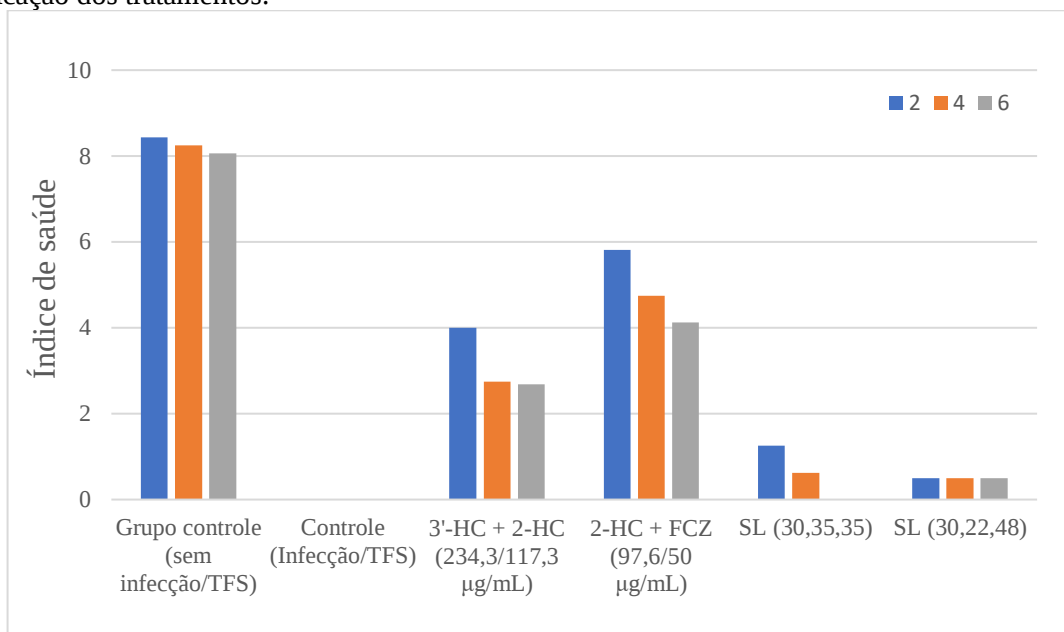


Figura 49. Índice de saúde de cada grupo de larvas após o 2º, 4º e 6º dia após a infecção com *C. albicans* e aplicação dos tratamentos.



De acordo com os resultados obtidos e demonstrados na Figura 48, as duas combinações avaliadas aumentaram a sobrevivência das larvas quando comparada ao grupo de larvas infectadas e sem tratamento (grupo controle de infecção) no entanto, a combinação da 2-HC com FCZ demonstrou melhor eficácia terapêutica em relação a 2-HC com 3'-HC. Estes resultados são reforçados pelos índices de saúde obtidos pois a combinação da 2-HC com FCZ também proporcionou maiores índices de saúde, ou seja, as larvas resistiram melhor às infecções. Os SLs testados não apresentaram eficácia terapêutica e por isso os índices de saúde também foram altos, sendo assim, a eficácia terapêutica deve-se somente aos princípios ativos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As moléculas de chalconas hidroxiladas (2-HC e 3'-HC), apresentaram atividade antifúngica *in vitro* contra *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* dentro da faixa de concentração de 0,244 a 125,0 µg/mL.

Os perfis de susceptibilidade das espécies de *Candida* à 2-HC e 3'-HC foram similares, no entanto, a 3'-HC apresentou maior espectro de ação fungicida em relação a 2-HC. *C. albicans* foi a única espécie resistente a ação fungicida tanto da 2-HC quanto da 3'-HC.

Nos ensaios de citotoxicidade, a 2-HC e 3'-HC apresentaram a concentração de 9,3 µg/mL como a maior concentração na qual não foi observado efeito citotóxico, ou seja, mínimo de 70% de células viáveis. A CE₅₀ para 2-HC foi de 14,98 µg/mL e para 3'-HC foi de 11,62 µg/mL; estes valores demonstraram que a 3'-HC possui maior citotoxicidade em relação à 2-HC. Este resultado corrobora com os resultados obtidos na determinação da CFM pois a 3'-HC demonstrou maior atividade fungicida e o IS foi menor que 10 por isso, também foi mais tóxica para as células (linhagem C33A).

Os IS obtidos indicam falta de toxicidade seletiva tanto para 2-HC quanto para 3'-HC. De acordo com as CIMs seriam necessárias concentrações acima de 9,3 µg/mL para inibir o crescimento fúngico das cinco espécies de *Candida* estudadas neste trabalho. No entanto, conforme os ensaios de citotoxicidade, valores acima de 9,3 µg/mL são citotóxicos.

A necessidade de redução da citotoxicidade das moléculas de hidroxichalconas justificaram as combinações destas com fluconazol, clotrimazol e combinadas também entre si.

Nos ensaios para avaliar a atividade antifúngica combinatória, todas as combinações mostraram-se interessantes. A melhor combinação foi a 2-HC com 3'-HC pois demonstrou redução das CIMs das duas moléculas e apresentou efeito sinérgico para todas as espécies de *Candida* estudadas. Outras combinações interessantes foram: 2-HC com fluconazol e 3'-HC com fluconazol pois foram obtidas interações sinérgicas e aditivas.

Além das interações obtidas nas combinações, foram observadas reduções das CIMs quando se utiliza os princípios ativos combinados e com isso, também foi observado redução da citotoxicidade. Os ensaios de citotoxicidade das combinações demonstraram que em alguns efeitos sinérgicos, também houve porcentagem de viabilidade celular acima de 70%.

Quanto ao desenvolvimento do SL, a partir da construção do diagrama de fases pseudoternário foram escolhidos dois sistemas para incorporação dos princípios ativos. Estes sistemas foram escolhidos por apresentarem elevada viscosidade, característica necessária para aplicação intravaginal da formulação e, por serem constituídos por mais de 50% de tensoativo/co-tensoativo e fase oleosa, para facilitar a incorporação e veiculação das

hidroxichalconas (moléculas com baixa solubilidade aquosa). Os dois SLs escolhidos são formados por: 30% de tensoativo/co-tensoativo (75:25, m/m), 35% fase oleosa e 35% de água e por 30% de tensoativo/co-tensoativo (75:25, m/m), 22% fase oleosa e 48% de água.

Na caracterização mecânica destes sistemas, os resultados obtidos demonstraram propriedades vantajosas para aplicação intravaginal; propriedades que foram superiores à formulação comercial, como por exemplo: dureza, compressibilidade, adesividade, coesão, força mucoadesiva e trabalho de seringabilidade. Os resultados obtidos demonstram que os SLs são capazes de ficar em contato com a mucosa infectada por período mais prolongado.

Com o objetivo de avaliar a capacidade dos SLs em incorporar os princípios ativos, foi inicialmente, desenvolvido e validado um método analítico para quantificação da 2-HC nos SLs.

A validação do método analítico desenvolvido, demonstrou que este é capaz de fornecer resultados seguros e confiáveis pois atendeu aos critérios exigidos em todos os parâmetros da validação de métodos analíticos. De acordo com os resultados obtidos na eficiência de encapsulação, o sistema composto por 30% de tensoativo/co-tensoativo (75:25, m/m), 35% de fase oleosa e 35% de água foi capaz de incorporar 92,96% da 2-HC adicionada e o sistema composto por 30% de tensoativo/co-tensoativo (75:25, m/m), 22% de fase oleosa e 48% de água foi capaz de incorporar 104,28% da 2-HC adicionada.

Os ensaios *in vivo* realizados neste trabalho foram conduzidos em modelo animal alternativo de *G. mellonella*. Foram avaliadas *in vivo*, as toxicidades e eficácias terapêuticas das combinações da 2-HC com 3'-HC, da 2-HC com fluconazol, dos princípios ativos sozinhos e dos SLs desenvolvidos.

Nos ensaios de toxicidade *in vivo*, nenhuma das concentrações testadas causou diminuição da sobrevida e redução dos índices de saúde das larvas, exceto a maior concentração de 2-HC com fluconazol, correspondente a 97,6 µg/mL de 2-HC e 50,0 µg/mL de fluconazol. Nesta concentração, o índice de saúde das larvas apresentou redução significativa em relação ao grupo controle. Vale ressaltar que os SLs também não apresentaram toxicidade pois não causaram redução da sobrevida e nem do índice de saúde.

Quanto a eficácia terapêutica, avaliada nas concentrações: 2-HC com 3'-HC: 117,3 + 234,3 µg/mL e 2-HC com FCZ: 97,6 + 50,0 µg/mL; as duas combinações demonstraram eficácia, no entanto, a combinação de 2-HC com fluconazol demonstrou ser mais efetiva.

Os ensaios por via tópica das combinações incorporadas nos SLs ainda serão executados para comparação com a via injetável e avaliação da permeação *in vivo*, por meio da recuperação

da carga fúngica após administração dos tratamentos. A caracterização física estrutural dos SLs também será realizada para verificar a forma como estes sistemas se organizam e a presença de nanoestruturas. Estes ensaios ainda estão em execução pois o contexto da pandemia acarretou alguns entraves e atraso na conclusão do trabalho.

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que, a 2-hidroxichalcona e 3'-hidroxichalcona apresentam atividade antifúngica contra espécies de *Candida spp.* e que as suas associações com derivados azólicos e associadas entre si, possuem excelente atividade antifúngica utilizando-se concentrações reduzidas, o que reduziu também a toxicidade destas moléculas, atingindo o objetivo deste trabalho.

Os sistemas desenvolvidos apresentaram características mecânicas satisfatórias para aplicação intravaginal e podem ser utilizados para veicular a 2-hidroxichalcona.

De modo geral, os princípios ativos estudados neste trabalho apresentaram ausência de toxicidade e demonstraram eficácia terapêutica em modelo *in vivo* de *G. mellonella*, após infecção das larvas com *C. albicans*, o que também atingiu o objetivo deste trabalho no sentido de propor uma nova possibilidade terapêutica para tratamento da CVV.

Os resultados obtidos foram satisfatórios e por isso, é importante dar continuidade a este projeto de pesquisa para realização de estudos clínicos.

8 REFERÊNCIAS **BIBLIOGRÁFICAS**

- ABALLÉA, S.; GUELFUCCI, F.; WAGNER, J.; KHEMIRI, A.; DIETZ, J.-P.; SOBEL, J.; TOUMI, M. Subjective health status and health-related quality of life among women with Recurrent Vulvovaginal Candidosis (RVVC) in Europe and the USA. **Health and quality of life outcomes**, v. 11, n. 1, p. 169, 2013.
- ALLEGRA, E.; TITBALL, R. W.; CARTER, J.; CHAMPION, O. L. *Galleria mellonella* larvae allow the discrimination of toxic and non-toxic chemicals. **Chemosphere**, v. 198, p. 469–472, 2018.
- Anon. (1992). Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods. In: H.D. Isenberg (Ed.), **Clinical Microbiology Procedures Handbook**. (p. 5.18.1– 5.18.28). American Society for Microbiology, Washington, DC.
- ANVISA. Resolução da diretoria colegiada - RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017. Validação de métodos analíticos. 2017.
- AOAC. Guidelines for Standard Method Performance Requirements (Appendix F), 2016.
- ARAÚJO, D.; HENRIQUES, M.; SILVA, S. Portrait of *Candida* Species Biofilm Regulatory Network Genes. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 62-75, 2017.
- ARAÚJO, M. G. F.; PACÍFICO, M.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C.; ICELY, P. A.; MIRÓ, M. S.; BAUAB, T. M.; SOTOMAYOR, C. E. Evaluation of *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhl. extract as antifungal and in treatment of vulvovaginal candidiasis. **Medical Mycology**, v. 51, n. 7, p. 673–682, 2013.
- ARROWSMITH, J. Trial watch: Phase II and Phase III attrition rates 2011-2012. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 8, p. 569, 2012.
- BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. B. G. Candidíase. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 22, n. 1, p. 22-38, 2010.
- DE BARROS, P. P.; SCORZONI, L.; RIBEIRO, F. de C.; FUGISAKI, L. R. de O.; FUCHS, B. B.; MYLONAKIS, E.; JORGE, A. O. C.; JUNQUEIRA, J. C.; ROSSONI, R. D. *Lactobacillus paracasei* 28.4 reduces in vitro hyphae formation of *Candida albicans* and prevents the filamentation in an experimental model of *Caenorhabditis elegans*. **Microbial pathogenesis**, v. 117, p. 80–87, 2018.
- BARROS, P. P.; ROSSONI, R. D.; RIBEIRO, F. C.; SILVA, M. P.; SOUZA, C. M.; JORGE, A. O. C.; JUNQUEIRA, J. C. Two sporulated *Bacillus* enhance immunity in *Galleria mellonella* protecting against *Candida albicans*. **Microbial pathogenesis**, v. 132, p. 335–342, 2019.
- BELLIO, P.; FAGNANI, L.; NAZZICONE, L.; CELENZA, G. New and simplified method for drug combination studies by checkerboard assay. **MethodsX**, v. 8, 2021.
- BERNEGOSI, J.; CALIXTO, G. M. F.; SANCHES, P. R. S.; FONTANA, C. R.; CILLI, E. M.; GARRIDO, S. S.; CHORILLI, M. Peptide KSL-W-loaded mucoadhesive liquid crystalline vehicle as an alternative treatment for multispecies oral biofilm. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 21, n. 1, p. E37, 2015.
- BRANDOLT, T. M.; KLAFKE, G. B.; GONÇALVES, C. V.; BITENCOURT, L. R.; MARTINEZ, A. M. B.; MENDES, J. F.; MEIRELES, M. C. A.; XAVIER, M. O. Prevalence of *Candida* spp. in cervical-vaginal samples and the *in vitro* susceptibility of isolates. **Brazilian Journal of microbiology**, v. 48, p. 145-150, 2017.
- BURIN, R.; BURIN, V. M.; TAHA, P.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Validation of a analytical methodology for calcium determination in meat products. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 4, p. 973-978, 2008.
- BUSQUET, F.; STRECKER, R.; RAWLINGS, J. M.; BELANGER, S. E.; BRAUNBECK, T.; CARR, G. J.; CENJIN, P.; FOCHTMAN, P.; GOURMELON, A.; HUBLER, N.; KLEENSANG, A.; KNOBEL, M.; KUSSATZ, C.; LEQLER, J.; LILICRAP, A.; MARTÍNEZ-JERÓNIMO, F.; POLLEICHTNER, C.; RZODECZKO, H.; SALINAS, E.; SCHNEIDER, K. E.; SCHOLZ, S.; VAN DEN BRANDHOF, E. J.; VAN DER VEM, L. T.; WALTER-ROHDE, D.; WITTERS, H.; HALDER, M. OECD validation

- study to assess intra- and inter-laboratory reproducibility of the zebrafish embryo toxicity test for acute aquatic toxicity testing. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 69, n. 3; p. 496-511, 2014.
- CALIXTO, G. M. F. **Sistemas precursores de cristais líquidos mucoadesivos para administração bucal de peptídeo antigelatinolítico associados à terapia fotodinâmica no tratamento do câncer bucal**. Tese, 2017.
- CAMPOS-SILVA, R.; BRUST, F. R.; TRENTIN, D. S.; MACEDO, A. J. Alternative method in *Galleria mellonella* larvae to study biofilm infection and treatment. **Microbial pathogenesis**, v. 137, n. 103756, p. 103756, 2019.
- CAMPOY, S.; ADRIO, J. L. Antifungals. **Biochemical Pharmacology**, v. 133, p. 86-96, 2017.
- CARBONE, C.; FUOCHI, V.; ZIELIŃSKA, A.; MUSUMECI, T.; SOUTO, E. B.; BONACCORSO, A.; PUGLIA, C.; PETRONIO, G.; FURNERI, P. M. Dual-drugs delivery in solid lipid nanoparticles for the treatment of *Candida albicans* mycosis. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, v. 186, n. 110705, p. 110705, 2020.
- CARLSSON, G.; NORRGREN, L.; HYLLAND, K.; TOLLEFSEN, K. E. Toxicity screening of produced water extracts in a zebrafish embryo assay. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 77, n. 9-11, p. 600-15, 2014.
- CASTRO, T. L.; COUTINHO, H. D. M.; GEDEON, C. C.; DOS SANTOS, J. M.; SANTANA, W. J.; SOUZA, L. B. S. Mecanismos de resistência da *Candida sp* WWA antifúngicos. **Infarma**, v. 18, n. 9/10, p. 30-35, 2006.
- CHAMPION, O. L.; TITBALL, R. W.; BATES, S. Standardization of *G. mellonella* Larvae to Provide Reliable and Reproducible Results in the Study of Fungal Pathogens. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 108, 2018.
- CLAUDINO, A. L. R.; GRANJA, C. S.; LIMA, A. R.; PAULA, C. R.; ALEVA, N. A.; SILVA, R. B.; CHAVASCO, J. K. Determinação da Concentração Inibitória Mínima do Clotrimazol e da Terbinafina sobre isolados de *Candida albicans* oriundas da mucosa bucal de pacientes HIV positivos e HIV negativos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações**, v. 10, n. 1, p. 95-104, 2012.
- Clinical & Laboratory Standards Institute: CLSI Guidelines. M27-A3: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, 2008.
- CORRÊA, P. R.; DAVID, P. R. S.; PERES, N. P.; CUNHA, K. C.; ALMEIDA, M. T. G. Caracterização fenotípica de leveduras isoladas da mucosa vaginal em mulheres adultas. **Revista brasileira de ginecologia e obstetrícia**, v. 31, n. 4, p. 177-181, 2009.
- CORREA-ROYERO, J.; TANGARIFE, V.; DURÁN, C.; STASHENKO, E.; MESA, A. *In vitro* antifungal activity and cytotoxic effect of essential oils and extracts of medicinal and aromatic plants against *Candida krusei* and *Aspergillus fumigatus*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 5, p. 734-741, 2010.
- CRESPO-ORTIZ, M. D. P.; BURBANO, M. E.; BARRETO, M. Pathogenesis and *in vivo* interactions of human *Streptococcus agalactiae* isolates in the *Galleria mellonella* invertebrate model. **Microbial pathogenesis**, v. 147, n. 104400, p. 104400, 2020.
- DADAR, M.; TIWARI, R.; KARTHIK, K.; CHAKRABORTY, S.; SHAHALI, Y.; DHAMA, K. *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control – An update. **Microbial Pathogenesis Journal**, v. 117, p. 128–138, 2018.
- DALAZEN, D.; ZANROSSO, D.; WANDERLEY, L.; SILVA, N. L.; FUENTEFRÍA, A. M. comparison of susceptibility profile among clinical isolates of oral and vulvovaginal *Candida spp.* in southern Brazil. **Brazilian Journal of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 47, n. 1, p. 33-38, 2011.
- DANTAS LEAL, R.M.; PAVIE CARDOSO LIMA, M. C. N.; TOZETTO KLEIN, S.D. O.; LORDELO GARBOGGI, P. V. S. TRATAMENTO DA CANDIDÍASE VULVOVAGINAL E NOVAS

PERSPECTIVAS TERAPÊUTICAS: UMA REVISÃO NARRATIVA. **Revista Pesquisa em Fisioterapia**, v. 6, n. 4, 2016.

D'CRUZ, O. J.; UCKUN, F. M. Gel-microemulsions as vaginal spermicides and intravaginal drug delivery vehicles. **Contraception**, v. 64, n. 2, p.113-123, 2001.

DE JESÚS ACOSTA-COTA, S.; AGUILAR-MEDINA, E. M.; RAMOS-PAYÁN, R.; RENDÓN MALDONADO, J. G.; ROMERO-QUINTANA, J. G.; MONTES-AVILA, J.; SARMIENTO-SÁNCHEZ, J. I.; PLAZAS-GUERRERO, C. G.; VERGARA-JIMÉNEZ, M. J.; SÁNCHEZ-LÓPEZ, A.; CENTURIÓN, D.; OSUNA-MARTÍNEZ, U. Therapeutic effect of treatment with metformin and/or 4-hydroxychalcone in male Wistar rats with nonalcoholic fatty liver disease. **European journal of pharmacology**, v. 863, n. 172699, p. 172699, 2019.

DÍAZ-TIELAS, C.; GRAÑA, E.; REIGOSA, M. J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A. M. Biological activities and novel applications of chalcones. **Planta daninha**, v. 34, n. 3, 2016.

DUARTE, R. S. **Desenvolvimento e validação do método de quantificação de catequinas e caracterização de extratos de folhas de *Maytenus ssp* utilizando UHPLC/MS**. Dissertação de mestrado, 2019.

EISSA, L. A.; ELSHERBINY, N. M.; MAGHMOMEH, A. O. Effect of 2- hydroxychalcone on adiponectin level in type 2 diabetes induced experimentally in rats. **Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 4, p. 1–8, 2017.

ELFEKY, D. S.; GOHAR, N. M.; EL-SEIDI, E. A.; EZZAT, M. M.; ABOELEW, S. H. Species identification and antifungal susceptibility pattern of *Candida* isolates in cases of vulvovaginal candidiasis. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 52, p. 269–277, 2016.

ESCOBAR, S. J. M.; SIMONE, M.; NATHAN, M.; RIBEIRO, C. A. O.; MARTINEZ, G. R. M.; WINNISCHOFER, S. M. B.; WITTING, P. K.; ROCHA, M. E. M. Cytotoxic effects of 4'-hydroxychalcone on human neuroblastoma cells (SH-SY5Y). **Toxicology in Vitro**, v. 61, 2019.

FARAHYAR, S.; IZADI, S.; RAZMJOU, E.; FALAHATI, M.; ROODBARY, M.; ASHRAFI-KHOZANI, M.; ANSARI, S.; FATTAHI, A.; GHAHRI-MOBASER, Z.; RAHIMI, M. Low prevalence of antifungal resistant *Candida africana*, in the *C. albicans* complex causing vulvovaginal candidiasis. **Heliyon**, v. 6, n. 3, p. e03619, 2020.

FÉNERO, C. I. M. Estudo do modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS em larvas de zebrafish (*Danio rerio*). (Dissertação de Mestrado). 2015. Universidade de São Paulo (São Paulo, Brasil). p. 72.

FERNANDES, L. S.; AMORIM, Y. M.; SILVA, E. L.; SILVA, S. C.; SANTOS, A. J. A.; PEIXOTO, F. N.; PIRES, L. M. N.; SAKAMOTO, R. Y.; PINTO, F. C. H.; SCARPA, M. V. C.; ARAÚJO, M. G. F. Formulation, stability study, and pre-clinical evaluation of a vaginal cream containing curcumin in a rat model of vulvovaginal candidiasis. **Mycoses**, v. 61, n. 10, p. 723–730, 2018.

FERRÃO, S. K.; BUTZGE, J.; MEZZOMO, L.; CALIL, L. N.; APEL, M.; MEZZARI, A.; LIMBERGER, R. P. Antifungal activity of essential oils against *Candida spp*. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 1, p. 100–113, 2020.

FERREIRA, M. K. A.; FONTENELLE, R. O. S.; MAGALHÃES, F. E. A.; BANDEIRA, P. N. S.; MENEZES, J. E. S. A.; DOS SANTOS, H. Chalcones Potencial Farmacológico: Uma Breve Revisão. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 5, p. 1455-1473, 2018.

FUKAZAWA, E. I. **Influência da candidíase vulvovaginal recorrente na qualidade de vida** (Dissertação de mestrado). Universidade de São Paulo. 2018.

FURLANETO-MAIA, L.; SPECIAN, A. F. L.; THORN, D. S. W.; OLIVEIRA, M. T.; FURLANETO, M. C. Estudo da incidência de amostras clínicas do gênero *Candida* isoladas de diversos sítios anatômicos. **Acta Scientiarum Health Sciences**, v. 29, n. 1, p. 33-37, 2007.

GALINDO-VILLEGAS, J. Recent findings on vertebrate developmental immunity using the Zebrafish model. **Molecular Immunology**, v. 69, p. 106–112, 2016.

- GIRALDO, P. C.; RIBEIRO-FILHO, A. D.; SIMÕES, J. A.; NOWAKONSKY, A. F.; ALMEIDA, V. C.; CAMPAGNARO, A. L. Dificuldades na interpretação clínica das vulvovaginites. *Boletim Informativo de la Union*, v. 19, n. 73-76, 1994.
- GOMES, M. C.; MOSTOWY, S. The Case for Modeling Human Infection in Zebrafish. **Trends in Microbiology**, v. 28, n. 111, 2020.
- GUENNEC, R. L.; REYNES, J.; MALLIE, M.; PUJOL, C.; JANBON, F.; BASTIDE, J. M. Fluconazole- and Itraconazole-Resistant *Candida albicans* Strains from AIDS Patients: Multilocus Enzyme Electrophoresis Analysis and Antifungal Susceptibilities. **Journal of clinical microbiology**, v. 33, n. 10, p. 2732-2737, 1995.
- GULLO, F. P. Novas alternativas terapêuticas para o tratamento da criptococose: análogos de resveratrol e microRNAs. 2016. Tese de Doutorado – Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp – Faculdade de Ciências Farmacêuticas) (Araraquara – Brasil). p.180.
- GULLO, F. P.; SARDI, J. C. O.; SANTOS V. A. F. F. M.; SANGALLI-LEITE, F.; PITANGUI, N. S.; ROSSI, A. S.; SILVA, A. C. A. P.; SOARES, L. A.; SILVA, J. F.; OLIVEIRA, H. C.; FURLAN, M.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. Antifungal activity of Maytenin and Pristimerin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1–6, 2012.
- GÜNDEL, S. S.; DE GODOI, S. N.; SANTOS, R. C. V.; DA SILVA, J. T.; LEITE, L. B. M.; AMARAL, A. C.; OURIQUE, A. F. *In vivo* antifungal activity of nanoemulsions containing eucalyptus or lemongrass essential oils in murine model of vulvovaginal candidiasis. **Journal of drug delivery science and technology**, v. 57, n. 101762, p. 101762, 2020.
- GUNTHER, L. S. A.; MARTINS, H. P. R.; GIMENES, F.; ABREU, A. L. P.; CONSOLARO, M. E. L.; SVIDZINSKI, T. I. E. Prevalence of *Candida albicans* and non-*albicans* isolates from vaginal secretions: comparative evaluation of colonization, vaginal candidiasis and recurrent vaginal candidiasis in diabetic and non-diabetic women. **São Paulo Medical Journal**, v. 132, n. 2, p. 116-120, 2014.
- HOLANDA, A. A. R.; FERNANDES, A. C. S.; BEZERRA, C. M.; FERREIRA, M. A. F.; HOLANDA, M. R. R.; HOLANDA, J. C. P.; MILAN, E. P. Candidíase vulvovaginal: sintomatologia, fatores de risco e colonização anal concomitante. **Revista brasileira de ginecologia e obstetrícia**, v. 29, n. 1, p. 3-9, 2007.
- HSIEH, M. H.; YU, C. M.; YU, V. L.; CHOW, J. W. Synergy assessed by checkerboard a critical analysis. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 16, n. 4, p. 343–349, 1993.
- ICH. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). International Conference on Harmonization. Geneva, Switzerland, 2005, p.11-12.
- IGARTÚA, D. E.; MARTINEZ, C. S.; ALONSO, S. del V.; CHIARAMONI, N. S.; PRIETO, M. J. Toxicity assessment of free and dendrimer-complexed curcumin in zebrafish larvae. **PharmaNutrition**, v. 13, n. 100201, p. 100201, 2020.
- INMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos: Documento de caráter orientativo. Portal INMETRO, 2010. Disponível em: <http://www4.inmetro.gov.br/>. Acessado em: 05 de março de 2021.
- ISO – International Organization for Standardization. ISO 10993-5 – Biological Evaluation of medical devices. Part 5: Testes for in vitro cytotoxicity, 3ª Ed, ISO, 2009.
- JUAN-GARCÍA, A.; BIND, M.; ENGERT, F. Larval zebrafish as an *in vitro* model for evaluating toxicological effects of mycotoxins. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 202, 110909, 2020.
- KARTHIKEYAN, C.; MOORTHY, N. S.H. N.; RAMASAMIA, S.; VANAM, U.; MANIVANNAN, E.; KARUNAGARAN, D.; TRIVEDI, P. Avança em chalcones com atividades anticancerígenas. **Patentes recentes sobre descoberta de medicamentos anticâncorológicos**, v. 10, n. 1, p. 97-115, 2015.

- KEPPANAN, R.; SIVAPERUMAL, S.; CHADRA KANTA, D.; AKUTSE, K. S.; WANG, L. Molecular docking of protease from *Metarhizium anisopliae* and their toxic effect against model insect *Galleria mellonella*. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 138, p. 8–14, 2017.
- KIM, J.; SUDBERY, P. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. **Journal of Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 171–177, 2011.
- KIM, S. Y.; LEE, IK-SOO; MOON, A. 2-Hydroxychalcone and xanthohumol inhibit invasion of triple negative breast cancer cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 203 p. 565–572, 2013.
- KRISHNASAMY, L.; RUBINI, D.; SENTHILGANESH, J.; SAIKUMAR, C.; KUMARAMANICKAVEL, G.; ARUNI, A. W.; NITHYANAND, P. Phylogenetic characterization of biofilm forming multidrug resistant *Candida albicans* and Non *albicans* *Candida* causing vulvovaginal candidiasis. **Gene reports**, v. 19, n. 100644, p. 100644, 2020.
- LAWS, T. R.; HARDING, S. V.; SMITH, M. P.; ATKINS, T. P.; TITBALL, R. W. Age influences resistance of *Caenorhabditis elegans* to killing by pathogenic bacteria. **FEMS microbiology letters**, v. 234, n. 2, p. 281–287, 2004.
- LEE, J.-Y.; PARK, H.; LIM, W.; SONG, G. Developmental toxicity of chlorpropham induces pathological changes and vascular irregularities in zebrafish embryos. Comparative biochemistry and physiology. **Toxicology & pharmacology: CBP**, v. 236, n. 108802, p. 108802, 2020.
- LI, D.; DENG, Y.; WANG, S.; DU, H.; XIAO, G.; WANG, D. Assessment of nanopolystyrene toxicity under fungal infection condition in *Caenorhabditis elegans*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 197, n. 110625, p. 110625, 2020.
- LI, W.; YUAN, M.; WU, Y.; LIU, X. Bixafen exposure induces developmental toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Environmental research**, v. 189, n. 109923, p. 109923, 2020.
- LINHARES, I. M.; GIRALDO, P. C.; CAETANO M. E.; NISSA, M. D.; GONÇALVES, A. K.; GIRALDO, H. P. D. Candidíase vulvovaginal recorrente: fisiopatogênese, diagnóstico e tratamento. **Revista Ciências Médicas**. v. 14, p. 373–378, 2005.
- LIU, J. Y.; SHI, C.; WANG, Y.; LI, W. J.; ZHAO, Y.; XIANG, M. J. Mechanisms of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates from Shanghai, China. **Research in Microbiology**, v. 166, n. 3, p. 153 - 161, 2015.
- LO, H. J.; TSENG, K. Y.; KAO, Y. Y.; TSAO, M. Y.; LO, H. L.; YANG, Y. L. Cph1p negatively regulates MDR1 involved in drug resistance in *Candida albicans*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, n. 45, p. 617 - 621, 2015.
- LOCKHART, S. R. Current Epidemiology of *Candida* Infection. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 36, n. 17, p. 131 - 136, 2014.
- LOH; J. M.; ADENWALLA, N.; WILES, S.; PROFT, T. *Galleria mellonella* larvae as an infection model for group A streptococcus. **Virulence**, v. 4, p. 419–428, 2013.
- MANE, A.; VIDHATE, P.; KUSRO, C.; WAMAN, V.; SAXENA, V.; KULKARNI-KALE, U.; RISBUD, A. Molecular mechanisms associated with Fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* isolates from India. **Mycoses**, v. 59, p. 93–100, 2016.
- MARIMON-BOLÍVAR, W.; TEJEDA-BENÍTEZ, L. P.; NÚÑEZ-AVILÉS, C. A.; DE LÉON-PÉREZ, D. D. Evaluation of the *in vivo* toxicity of green magnetic nanoparticles using *Caenorhabditis elegans* as a biological model. **Environmental Nanotechnology Monitoring & Management**, v. 12, n. 100253, p. 100253, 2019.
- MARKAKI, M.; TAVERMNAKIS, N. *Caenorhabditis elegans* as a model system for human diseases. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 63, p. 118–125, 2020.
- MATHESON, A.; MAZZA, D. Recurrent vulvovaginal candidiasis: A review of guideline recommendations. **The Australian & New Zealand journal of obstetrics & gynaecology**, v. 57, n. 2, p. 139–145, 2017.

- MEDINA-ALARCÓN, K. P.; SINGULANI, J. L.; DUTRA, L. A.; PITANGUI, N. S.; SILVA, M. A. P.; SANTOS, M. B.; AYUSSO, G. M.; REGASINI, L. O.; SOARES, C. P.; CHORILLI, M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. Antifungal activity of 2'-hydroxychalcone loaded in nanoemulsion against *Paracoccidioides spp.* **Future Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 21–33, 2020.
- MEYER, K. A.; DERAEDT, M. F.; HARRINGTON, A. T.; DANZIGER, L. H.; WENZLER, E. Efficacy of oritavancin alone and in combination against vancomycin-susceptible and -resistant enterococci in an *in-vivo* *Galleria mellonella* survival model. **International journal of antimicrobial agents**, v. 54, n. 2, p. 197–201, 2019.
- MIRÓ, M. S.; RODRÍGUEZ, E.; VIGEZZI, C.; ICELY, P. A.; FREITAS ARAÚJO, M. G. F.; RIERA, F. O.; VARGAS, L.; ABIEGA, C.; CAEIRO, J. P.; SOTOMAYOR, C. E. Candidiasis vulvovaginal: una antigua enfermedad con nuevos desafíos. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 34, n. 2, p. 65–71, 2017.
- MORACE, G.; PERDONI, F.; BORGHI, E. Antifungal drug resistance in *Candida* species. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, n. 2, p. 254 - 259, 2014.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1/2, p. 55–63, 1983.
- NEVES, R. N.; SENA-LOPES, A.; ALVES, M. S. D.; FONSECA, B. R.; SILVA, C. C.; CASARIL, A. M.; SAVEGNAGO, L.; PEREIRA, C. M. P.; RAMOS, D. F.; BORSUK, S. 2'-Hydroxychalcones as an alternative treatment for trichomoniasis in association with metronidazole. **Parasitology Research**, v. 119, p. 725–736, 2020.
- OECD Guidelines** - No. 129 (GUIDANCE DOCUMENT ON USING CYTOTOXICITY TESTS TO ESTIMATE STARTING DOSES FOR ACUTE ORAL SYSTEMIC TOXICITY TESTS), 2010.
- OECD Guidelines for the Testing of Chemical** - Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test, 2019.
- OECD Guidelines for Testing of Chemicals** - Test No. 236: “Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test”, 2013.
- OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V. Microemulsões I: Fundamentos teóricos da formação do sistema microemulsionado. **Infarma**, v. 13, n. 9/10, 2001.
- OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CERA, L. F. R. Microemulsões II: Aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Infarma**, v. 14, n. 7/8, 2002.
- OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; RODRIGUES, L. F.; FORMARIZ, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 131–138, 2004.
- OWEN, D. H.; KATZ, D. F. A vaginal fluid simulant. **Contraception**, v. 59, n. 2, p. 91–95, 1999.
- PALANCO, A. C.; SINGULANI, J. L.; COSTA-ORLANDI, C. B.; GULLO, F. P.; LOURENCETTI, N. M. S.; GOMES, P. C.; AYUSSO, G. M.; DUTRA, L. A.; BOLZANI, V. S.; REGASINI, L. O.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. Activity of 3'-hydroxychalcone against *Cryptococcus gattii* and toxicity, and efficacy in alternative animal models. **Future Microbiology**, v. 12, n. 13, p. 1123–1134, 2017.
- PANDEY, S.; TIWARI, S.; KUMAR, A.; NIRANJAN, A.; CHAND, J.; LEHRI, A.; CHAUHAN, P. S. Antioxidant and anti-aging potential of Juniper berry (*Juniperus communis L.*) essential oil in *Caenorhabditis elegans* model system. *Industrial crops and products*, v. 120, p. 113–122, 2018.
- PANDIT, A.; KEDAR, A.; KOYATE, K. Hollow pessary loaded with lawsone via self-microemulsifying drug delivery system for vaginal candidiasis. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 60, n. 101955, p. 101955, 2020.
- PATEL, D. A.; GILLESPIE, B.; SOBEL, J. D.; LEAMAN, D.; NYIRJESY, P.; WEITZ, V.; FOXMAN, B. Risk factors for recurrent vulvovaginal candidiasis in women receiving maintenance antifungal

- therapy: Results of a prospective cohort study. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, n. 190, p. 644 - 653, 2004.
- PAVAN, F. R.; DA S MAIA, P. I.; LEITE, S. R. A.; DEFLON, V. M.; BATISTA, A. A.; SATO, D. N.; FRANZBLAU, S. G.; LEITE, C. Q. F. Thiosemicarbazones, semicarbazones, dithiocarbazates and hydrazide/hydrazones: anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity and cytotoxicity. **European journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 5, p. 1898–1905, 2010.
- POWELL, A. M; NYIRJESY, P. Recurrent vulvovaginitis. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, n. 28, p. 967 - 976, 2014.
- PRASAD, R.; KAPOOR, K. Multidrug Resistance in Yeast *Candida*. **International Review of Cytology**, v. 242, p. 215 - 248, 2005.
- PROTOPOPOVA, M.; HANRAHAN, C.; NIKONENKO, B.; SAMALA, R.; CHEN, P.; GEARHART, J.; EINCK, L.; NACY, C. A. Identification of a new antitubercular drug candidate, SQ109, from a combinatorial library of 1,2-ethylenediamines. **The journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 56, n. 5, p. 968–974, 2005.
- RAJESHKUMAR, R.; SUNDARARAMAN, S. Emergence of *Candida spp.* and exploration of natural bioactive molecules for anticandidal therapy – status Quo. **Mycoses**, v. 55, p. 60–73, 2012.
- RAMMOHAN, A.; REDDY, J. S.; RAO, G. S. C. N.; ZYRYANOV, G. V. Chalcone synthesis, properties and medicinal applications: a review. **Environmental Chemistry Letters**, n. 18, p. 433–458, 2020.
- RAO, L. V.; MAHMOOD, T. Vaginal discharge. **Obstetrics, gynecology and reproductive medicine**, v. 30, n. 1, p. 11-18, 2019.
- ROCHA, W. R. V.; NUNES, L. E.; NEVES, M. L. R.; XIMENES, E. C. P. A.; ALBUQUERQUE, M. C. P. A. Gênero *Candida* - Fatores de virulência, Epidemiologia, Candidíase e Mecanismos de resistência. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, p. e43910414283, 2021.
- RODRIGUES, M. E.; SILVA, S.; AZEREDO, J.; HENRIQUES, M. Novel strategies to fight *Candida* species infection. **Critical Reviews in Microbiology**; v. 42, n. 4, p. 594–606, 2016.
- ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, Á. S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials research**, v. 6, n. 3, p. 317–320, 2003.
- ROSSONI, R. D.; RIBEIRO, F. de C.; DOS SANTOS, H. F. S.; DOS SANTOS, J. D.; OLIVEIRA, N. de S.; DUTRA, M. T. D. S.; DE LAPENA, S. A. B.; JUNQUEIRA, J. C. *Galleria mellonella* as an experimental model to study human oral pathogens. **Archives of oral biology**, v. 101, p. 13–22, 2019.
- SADER, H. S.; HUYNH, H. K.; JONES, R. N. Contemporary *in vitro* synergy rates for aztreonam combined with newer fluoroquinolones and beta-lactams tested against gram-negative bacilli. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 47, n. 3, p. 547–550, 2003.
- SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; LASS-FLORL, C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. **Mycoses**, v. 58, n. 2, p. 2-13, 2015.
- SANTANA, D. P.; RIBEIRO, T. F.; RIBEIRO, E. L.; AQUINO, G. L. B.; NAVES, P. L. F. Ação de chalconas contra a formação de biofilme de *Candida albicans*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 36, n. 1, 2015.
- SARVARI, M.; MIKANI, A.; MOHAMEHRABADI, M. The innate immune gene Relish and Caudal jointly contribute to the gut immune homeostasis by regulating antimicrobial peptides in *Galleria mellonella*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 110, 103732, 2020.
- SAWANT, B.; KHAN, T. Recent advances in delivery of antifungal agents for therapeutic management of candidiasis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 1478–1490, 2017.
- SCORZONI, L.; DE LUCAS, M. P.; SINGULANI, J. L.; OLIVEIRA, H. C.; ASSATO, P. A.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNIN, M. J. S. Evaluation of *Caenorhabditis elegans* as a host

- model for *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii*. **Pathogens and disease**, v. 76, n. 1, 2018.
- SCORZONI, L.; PAULA E SILVA, A. C. A.; SINGULANI, J. L.; LEITE, F. S.; OLIVEIRA, H. C.; SILVA, R. A. M.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Comparison of virulence between *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* using *Galleria mellonella* as a host model. **Virulence**, v. 6; n. 8, p. 766-776, 2015.
- SINGULANI, J. L.; PEDROSO, R. S.; RIBEIRO, A. B.; NICOLELLA, H. D.; FREITAS, K. S.; DAMASCENO, J. L.; VIEIRA, T. M.; CROTTI, A. E. M.; TAVARES, D. C.; MARTINS, C. H. G.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; PIRES, R. H. Geraniol and linalool anticandidal activity, genotoxic potential and embryotoxic effect on zebrafish. **Future microbiology**, v. 13, n. 15, p. 1637-1646, 2018.
- SOARES, D. M.; LIMA, E. O.; SOARES, D. M. M.; SILVA, N. F.; COSTA, N. G. M.; FARIA, F. S. E. D. V.; RODRIGUEZ, A. F. R. Vulvovaginal candidiasis: A literature review with a approach to *Candida albicans*. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 25, n. 1, p. 28-34, 2018.
- SOBEL, J. D. Recurrent vulvovaginal candidiasis. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 214, p. 15-21, 2015.
- SOBEL, J. D. Vulvovaginal candidosis. **Lancet**, v. 369, p. 1961 –1971, 2007.
- SOBEL, J. D.; FARO, S.; FORCE, R. W.; FOXMAN, B.; LEDGER, W. J.; NYIRJESY, P. R.; REED, B. D.; SUMMERS, P. R. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 178, n. 2, p. 203 – 211, 1998.
- SULSTON, J.; HODGKIN, J. Methods. In *The Nematode Caenorhabditis elegans*, vol. 1 (ed. W. B. Wood), pp. 587-606. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
- SUN, Y.; CAO, Y.; TONG, L.; TAO, F.; WANG, X.; WU, H.; WANG, M. Exposure to prothioconazole induces developmental toxicity and cardiovascular effects on zebrafish embryo. **Chemosphere**, v. 251, n. 126418, p. 126418, 2020.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. [S.l.: s. n.], 2012a.
- TOZZO, A. B.; GRAZZIOTIN, N. A. Vulvovaginal Candidiasis. **Revista Perspectiva (Erechim)**, v. 36, n. 133, p. 53-62, 2012.
- TZOUVELEKIS, L. S.; MARKOGIANNAKIS, A.; PIPERAKI, E.; SOULI, M.; DAIKOS, G. L. Treating infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 20, n. 9, p. 862–872, 2014.
- UDDIN, M. N.; KNOCK, M. N. H.; UZZAMAN, M.; BHUIYAN, M. M. H.; SANALLAH, A. F. M.; SHUMI, W.; SADRUL AMIN, H. M. Microwave assisted synthesis, characterization, molecular docking and pharmacological activities of some new 2'-hydroxychalcone derivatives. **Journal of molecular structure**, v. 1206, n. 127678, p. 127678, 2020.
- VAN PELT, K. M.; TRUTTMANN, M. C. *Caenorhabditis elegans* as a model system for studying aging-associated neurodegenerative diseases. **Translational Medicine of Aging**, v. 4, p. 60-72, 2020.
- VAZ, R. L.; SOUSA, S.; CHAPELA, D.; VAN DER LINDE, H. C.; WILLEMSSEN, R.; CORREIA, A. D.; OUTEIRO, T. F.; AFONSO, N. D. Identification of antiparkinsonian drugs in the 6-hydroxydopamine zebrafish model. **Pharmacology, biochemistry and behavior**, v. 189, n. 172828, p. 172828, 2020.
- VERTYPOROKH, L.; KORDACZUK, J.; MAK, P.; HUŁAS-STASIAK, M.; WOJDA, I. Host-pathogen interactions upon the first and subsequent infection of *Galleria mellonella* with *Candida albicans*. **Journal of insect physiology**, v. 117, n. 103903, p. 103903, 2019.
- VERTYPOROKH, L.; WOJDA, I. Immune response of *Galleria mellonella* after injection with non-lethal and lethal dosages of *Candida albicans*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 170, 107327, 2020.

- VIEIRA, F. M. R. M. **Candida não albicans como patógenos emergentes**. 2016. (Dissertação de Mestrado). Instituto superior de Ciências da Saúde Egas Moniz (Almada, Portugal).
- VINCZE, K.; GEHRING, M.; BRAUNBECK, T. (Eco)toxicological effects of 2,4,7,9-tetramethyl-5-decyne-4,7-diol (TMDD) in zebrafish (*Danio rerio*) and permanent fish cell cultures. **Journal of Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 13, p. 8233-41, 2014.
- VRZAL, V.; BITTNER, L.; NEPERENY, J. Use of yeast lysate in women with recurrent vulvovaginal candidiasis. **Procedia in Vaccinology**, n. 9, p. 35 - 37, 2015.
- WANG, S.-H.; CHEN, C.-C.; LEE, C.-H.; CHEN, X.-A.; CHANG, T.-Y.; CHENG, Y.-C.; YOUNG, J.-J.; LU, J.-J. Fungicidal and anti-biofilm activities of trimethylchitosan-stabilized silver nanoparticles against *Candida* species in zebrafish embryos. **International journal of biological macromolecules**, v. 143, p. 724–731, 2020.
- WANG, B.; HUANG, L. H.; ZHAO, J. X; WEI, M.; FANG, H.; WANG, D. Y.; WANG, H. F.; YIN, J. G.; XIANG, M. ERG11 mutations associated with azole resistance in *Candida albicans* isolates from vulvovaginal candidosis patients. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 11, p. 909 - 914, 2015.
- XIE, Z.; LUO, X.; ZOU, Z.; ZHANG, X.; HUANG, F.; LI, R.; LIAO, S.; LIU, Y. Synthesis and evaluation of hydroxychalcones as multifunctional non-purine xanthine oxidase inhibitors for the treatment of hyperuricemia. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 27, n. 15, p. 3602–3606, 2017.
- XU, M.; WU, P.; SHEN, F.; JI, J.; RAKESH, K. P. Chalcone derivatives and their antibacterial activities: **Current development. Bioorganic chemistry**, v. 91, n. 103133, p. 103133, 2019. YODEN, W.J.; STEINER, E.H. Statistical Manual of the AOAC, 1975.
- ZHUANG, C.; ZHANG, W.; SHENG, C.; ZHANG, W.; XING, C.; MIAO, Z. Chalcone: A Privileged Structure in Medicinal Chemistry. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 12, p. 7762–7810, 2017.