

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta Tese será disponibilizado somente a partir de 25/01/2020.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, UNESP
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

BRUNA VIDAL BONIFÁCIO

Prospecção químico-biológica de extratos hidroetanólicos das folhas de
***Astronium urundeuva* na investigação do potencial antifúngico**

ARARAQUARA – SP

2018

BRUNA VIDAL BONIFÁCIO

**Prospecção químico-biológica de extratos hidroetanólicos das folhas de
Astronium urundeuva na investigação do potencial antifúngico**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Microbiologia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Taís Maria Bauab

ARARAQUARA – SP

2018

Ficha Catalográfica

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

Bonifácio, Bruna Vidal
B715p Prospeção químico-biológica de extratos hidroetanólicos das folhas de *Astronium urundeuva* na investigação do potencial antifúngico / Bruna Vidal Bonifácio. – Araraquara, 2018.
132 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 (Microbiologia).

Orientadora: Taís Maria Bauab.

1. *Astronium urundeuva* (Allemão) Engl. 2. Fitoquímica. 3. Atividade antifúngica. 4. *Candida* sp.
5. Candidíase vulvovaginal. 6. Biofilme. 7. *Checkerboard*. 8. Experimento de passagem seriada.
9. *Artemia salina* L. I. Bauab, Taís Maria, orient. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada por Maria Irani Colto CRB-8/4.440

CAPES: 40300005

Dedico este trabalho aos meus pais Sandra e Sidinei...

*“Não acredito que serei capaz de agradecer por tudo que seria necessário... Simplesmente decidi direcionar meu primeiro **OBRIGADO** a vocês por simplesmente serem meus pais. Afinal, não estaria aqui se não fosse pelo desejo, pelos planos e por todo o esforço que tiveram para que eu estivesse aqui! Meu sonho??? Poder algum dia retribuir pelo menos um pouco do que vocês fizeram e fazem até hoje por mim... Amo vocês!” ... Essas foram minhas palavras na dedicatória da minha dissertação de mestrado... E hoje, depois de 4 anos, escrevendo a dedicatória da tese de doutorado, vocês continuam sendo minha razão de estar aqui, me esforçando para fazer o meu melhor sempre, pois peço a Deus e ainda tenho fé que irei realizar meu sonho de poder dar **TUDO** o que vocês merecem em agradecimento a tudo que fizeram e ainda fazem por mim... Obrigada por me ensinarem cada dia a ser um ser humano melhor... Amo vocês!*

Meu muito obrigado...

A Deus e Nossa Senhora Aparecida por sempre me proteger, guiar e iluminar meu caminho nesta caminhada, pois seu que de joelhos sou muito mais forte e posso ir além...

Aos meus pais, Sandra e Sidinei, que sempre acreditaram na minha capacidade e me incentivaram a estar aqui desde o princípio;

A Profa. Dra. Tais Maria Bauab, minha orientadora... Serei eternamente grata por acreditar em mim desde o dia em que fui me apresentar. Obrigada por ter me recebido em seu laboratório com tanto carinho e sempre disposta a nos ensinar com essa dedicação inigualável. Agradeço também por toda proteção que você sempre teve conosco, cuidando de todos os alunos com tanto amor e carinho como se fossem filhos. Obrigada pela oportunidade concedida que me levarei para o resto de minha vida;

A minha co-orientadora Profa. Dra. Janaína Sardi por todo carinho e aprendizado. Agradeço muito por ter feito parte deste trabalho e por ter confiado em mim e me indicado para realizar o sanduíche com o Dr. Lopez. Se não fosse você jamais iria ter tido essa oportunidade que foi tão importante em minha vida. Obrigada pelos conselhos e por estar sempre disposta a me ajudar;

Ao Prof. Dr. José Luis Lopez-Ribot por ter me aceitado em seu laboratório e com tanto amor, dedicação e paciência ter me proporcionado esse período que considero essencial em minha vida. Tão quanto o crescimento profissional, esta oportunidade me fez crescer pessoalmente e serei eternamente grata a cada gesto seu para que eu pudesse me sentir em casa mesmo estando tão longe da minha família e amigos. Obrigada por ser esse ser humano incrível que cativa a todos;

Ao Prof. André Gonzaga dos Santos pela grande parceria juntos. Você foi essencial para a realização deste trabalho. Agradeço pelo carinho e paciência que sempre teve para poder me ensinar assuntos que jamais havia aprendido na área. Obrigada por me aconselhar para que tudo pudesse sair da melhor forma possível e também pode ter me recebido tão bem em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Marlus Chorilli, pela colaboração nos ensaios nanotecnológicos, parceria, amizade, incentivos, oportunidades oferecidas;

Ao Prof. Dr. Wagner Vilegas e ao aluno Leonardo Perez de Souza por fornecer os extratos de Astronium sp, pela amizade e por estarem sempre dispostos a me ajudar com todas as informações necessárias para a realização deste trabalho;

À Profa. Dra. Cássia Regina Primila Cardoso da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT) pela atenção e disposição concedida em relação ao processo de documentação de registro genético dos extratos de Astronium sp;

Ao Prof. Dr. Jorge Tamashiro pela coleta e identificação de Astronium urundeuva;

Aos professores doutores Daniel Rinaldo (UNESP Bauru) e Flávia Rezende (Universidade de Araraquara – UNIARA) pela amizade e por terem feito parte da minha banca de exame de qualificação de doutorado, cujas contribuições foram essenciais para que este trabalho pudesse ser finalizado;

Aos professores doutores, Elfriede Marianne Bacchi (Universidade de São Paulo – USP), Margarete Gotardo de Almeida (Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP), Ana Helena Januário (Universidade de Franca – UNIFRAN) e Flávia Rezende (Universidade de Araraquara – UNIARA) por aceitarem participar da minha banca de defesa de doutorado... Tenho certeza que as contribuições serão extremamente valiosas;

Ao Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan e a pós doutoranda Isabel Silva pela parceria nos ensaios de citotoxicidade. Agradeço também pela amizade e também por estarem sempre disponíveis a contribuir com nossos projetos;

A Profa. Dra. Lourdes C. dos Santos do laboratório de Fitoquímica por sempre me receber com carinho em seu laboratório e permitir a realização de diversas análises que foram de extrema importância para este projeto;

A Coordenadora da Pós-graduação e amiga Profa. Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro pela amizade e incentivos;

A secretária do Departamento de Ciências Biológicas, Margarete Rossi pela disposição e atenção;

As técnicas do laboratório de Microbiologia Néia, Débora e Sílvia por todo apoio técnico e por sempre estarem dispostas a ajudar e dividir conosco seus anos de experiência no laboratório;

Aos meus amigos do laboratório de Fisiologia de Microrganismos meu agradecimento especial a Luciani Toledo, Felipe Hilário, Matheus Ramos e Anderson Noronha pelo companheirismo e amizade. Agradeço por fazerem meus dias mais felizes e por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos. Vocês são os melhores companheiros que qualquer pessoa poderia ter... Amo vocês! Agradeço também as alunas de Iniciação Científica, Laura Caminitti, Veridiana Gomes e Jéssica Degrandi por estarem sempre dispostas a nos ajudar e aprender...

Um agradecimento mais que especial à minha amiga Patrícia Bento, que tem todo o meu respeito, carinho e admiração. A considero muito mais que uma amiga que faz o impossível para me ver bem tanto profissionalmente quanto pessoalmente. Agradeço por toda ajuda proporcionada em todos os sentidos e por estar sempre ao meu lado pro que der e vier. Não conseguiria expressar com palavras o tamanho do meu carinho e gratidão, amiga!

Aos amigos do laboratório de Farmacognosia Flávio Carvalho, Luiza Mota, Fernando Oda, Célia Martin e Caio Perego por estarem sempre dispostos a me ajudar no que fosse preciso. Obrigada também pela amizade e pelos momentos divertidos que passamos juntos;

Aos amigos do laboratório Candida's lab da UTSA (Estados Unidos) Taissa Vila, Semanti Sarkar, Gina Wall, Daniel Montelongo e Jesus Romo que me acolheram da melhor forma possível e tornaram esse momento mais que especial em minha vida. Agradeço por todos os ensinamentos, paciência e dedicação e principalmente pela amizade;

A minha amiga Katia Wilson que foi a melhor professora de inglês que eu poderia ter em San Antonio, TX durante a realização do doutorado sanduíche;

A minha amiga Laryssa Dietrich que em tão pouco tempo se tornou mais que especial em minha vida sempre me motivando a ser uma pessoa melhor em todos os sentidos e que mesmo longe, está sempre disposta a me ajudar, aconselhar e incentivar;

Aos amigos do laboratório de Micobacteriologia: Isabel Silva, Débora Leite e Camila Maringolo pela amizade e companheirismo;

As amigas Célia Casado, Laize Juvenal e Gabi Romão, minhas companheiras de casa, agradeço simplesmente pelo nosso convívio, sempre me proporcionando dias de muita alegria e me aconselhando em tudo que precisei;

Ao amigo Henrique Mesquita que esteve disposto a me ajudar em tudo o que precisasse sempre com a maior boa vontade e educação que uma pessoa poderia ter;

As funcionárias da Seção de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Cláudia Molina, Daniela Tita, Aniele Vilella, Christiane Calife pela atenção, cordialidade e amizade;

A Irani e demais funcionárias da Biblioteca da FCFar, por toda prestatividade e correção das referências deste trabalho;

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP):
- bolsas de doutorado no país (Processo 2013/25121-5) e exterior BEPE (2015/19011-8);

- aos projetos regulares processos número 2013/25432-0 e 2016/08559-5;
- projetos temáticos Biota processos número 02/05503-6 e 2009/52237-9;

A The University of Texas at San Antonio (UTSA) pela realização do doutorado sanduíche;

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, Araraquara.

RESUMO

Apesar do grande avanço tecnológico direcionado à indústria farmacêutica, os micro-organismos continuam adquirindo cada vez mais resistência aos fármacos convencionalmente utilizados e, pesquisadores de diversas áreas buscam novas fontes antimicrobianas de origem natural, a exemplo das plantas medicinais. Dentre as infecções fúngicas, destacam-se aquelas causadas por leveduras do gênero *Candida* sp. a exemplo da candidíase vulvovaginal (CVV). A planta *Astronium urundeuva* (Allemão) Engl. apresenta uma série de propriedades biológicas, incluindo a atividade antifúngica. Este trabalho teve como objetivo aprofundar os estudos direcionados a atividade antifúngica dessa planta medicinal de modo a investigar as substâncias responsáveis por esta propriedade biológica através do fracionamento biomonitorado. Dentre os componentes majoritários identificados no extrato (ácido gálico, galato de metila e galato de etila), pode-se observar que as substâncias galato de etila e galato de metila são responsáveis por grande parte da atividade antifúngica contra a espécie *C. glabrata* enquanto que a atividade contra a espécie *C. albicans* parece estar relacionada a um efeito sinérgico dos componentes do extrato, incluindo os minoritários. Os resultados do ensaio *in vivo* confirmaram a atividade antifúngica exibida pelo extrato, mas, além disso, mostrou uma melhor atividade do extrato incorporado na microemulsão (ME), confirmando o efeito fungicida *in vitro* apresentado por este. Os ensaios de citotoxicidade (IC₅₀), realizados frente às linhagens celulares VERO, MRC5 e HaCaT mostraram que o extrato não apresenta-se citotóxico quando comparado com o controle positivo utilizado (doxorrubicina). Além disso, após a incorporação do extrato em uma ME, o índice de seletividade (IS) aumentou significativamente principalmente quando analisado para a linhagem VERO. Quando testado contra os isolados clínicos de ambas as espécies de *Candida* sp., o extrato livre apresentou marcante atividade, mesmo contra aqueles considerados resistentes aos fármacos convencionalmente utilizados na terapia clínica (fluconazol, anfotericina B e caspofungina). Além do ensaio de susceptibilidade para células planctônicas, a amostra vegetal também foi avaliada quanto a sua atividade anti-biofilme e, embora não tenha apresentado atividade em biofilmes pré-formados nas concentrações testadas, o extrato livre foi capaz de inibir a formação de biofilme de *C. albicans* SC5314 na mesma concentração efetiva para células planctônicas (CIM₉₀ de 125-250 µg/mL). O estudo de combinação, avaliado pelo ensaio *checkerboard*, apresentou sinergismo quando o extrato livre foi combinado com fluconazol contra as duas espécies de *Candida* sp. Além disso, o efeito sinérgico também foi observado quando a anfotericina B foi combinada com o extrato livre (contra *C. albicans*) e o padrão de galato de etila (contra *C. glabrata*). Após o ensaio de passagem seriada, foi observado que as cepas desenvolveram resistência apenas ao fluconazol, mas não para o extrato livre. Além do gênero *Candida* sp., a amostra vegetal também foi testada contra o gênero *Cryptococcus* sp., destacando-se os resultados apresentados para a espécie *C. neoformans* WSA (CIM₉₀ 1,95 µg/mL) e, dentre alguns fungos filamentosos testados, a amostra vegetal mostrou-se efetiva apenas contra *Rhizopus arrhizus*. Os resultados mostraram que o extrato das folhas de *A. urundeuva* apresenta atividade antifúngica promissora contra as espécies de *Candida*, principalmente contra a espécie de *C. glabrata*.

Palavras-chave: *Astronium urundeuva* (Allemão) Engl. Fitoquímica. Atividade antifúngica. *Candida* sp. Candidíase vulvovaginal. Biofilme. *Checkerboard*. Experimento de passagem seriada. *Artemia salina* L.

ABSTRACT

Despite the great technological advances directed to the pharmaceutical industry, microorganisms continue to acquire more and more resistance to the drugs conventionally used in the therapy, and researchers from several areas keep searching new natural antimicrobial sources, such as medicinal plants. Among fungal infections, we highlight those caused by yeasts from the genus *Candida* sp., for example vulvovaginal candidiasis (VVC). *Astronium urundeuva* (Allemão) Engl. plant has various biological properties, including antifungal activity. This work aimed to improve the researches directed to the antifungal activity of this medicinal plant in order to investigate the substances responsible for this biological property using bioassay-guided fractionation technique. Among the major components identified in the extract (gallic acid, methyl gallate and ethyl gallate), we could observe that the substances ethyl gallate and methyl gallate are responsible a large part of the antifungal activity against *C. glabrata* species whereas the activity against *C. albicans* species seems to be related to a synergistic effect of the components of the extract, including the minority ones. The *in vivo* results confirmed the antifungal activity exhibited by the extract, but, in addition, showed a better activity of the extract loaded into a microemulsion (ME), confirming the *in vitro* fungicidal effect presented by it. The cytotoxicity assays (IC₅₀) performed for VERO, MRC5 and HaCaT cell lines showed that the extract were not cytotoxic when compared to the positive control (doxorubicin). In addition, after loaded into the ME, the selectivity index (SI) significantly increased, especially when analyzed for the VERO cell line. When tested against clinical isolates of both species of *Candida* sp., the free extract showed really effective activity, even against those considered resistant to the drugs conventionally used in clinical therapy (fluconazole, amphotericin B and caspofungin). In addition to the susceptibility test for planktonic cells, the plant sample was also evaluated for its anti-biofilm activity and, although it did not show activity in preformed biofilms at the concentrations that were tested, the free extract was able to inhibit the biofilm formation of *C. albicans* SC5314 at the same effective concentration for planktonic cells (MIC₉₀ of 125-250 µg/mL). The combination study, evaluated by the checkerboard assay, showed synergism when the free extract was combined with fluconazole against both species of *Candida* sp. In addition, the synergistic effect was also observed when amphotericin B was combined with the free extract (against *C. albicans*) and the ethyl gallate (against *C. glabrata*). After the serial passage assay, it was observed that the strains developed resistance only to fluconazole, but not to the free extract. In addition to the genus *Candida* sp., the plant sample was also tested against the genus *Cryptococcus* sp., highlighting the results presented for *C. neoformans* WSA (MIC₉₀ of 1.95 µg/mL) and, among some filamentous fungi that were tested, the plant sample was only effective against *Rhizopus arrhizus*. The results showed that *A. urundeuva* leaves extract presents promising antifungal activity against *Candida* species, especially for *C. glabrata*.

Keywords: *Astronium urundeuva* (Allemão) Engl. Phytochemistry. Antifungal activity. *Candida* sp. Vulvovaginal candidiasis. Biofilm. Checkerboard. Serial passage assay. *Artemia salina* L.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura de <i>C. albicans</i> na forma de levedura, hifas e/ou pseudohifas.	25
Figura 2. Mecanismos de ação dos diferentes agentes antifúngicos disponíveis na terapia clínica.	27
Figura 3. Processo de formação de um biofilme microbiano através aderência (etapas 1 e 2), expansão e maturação (etapas 3 e 4) e dispersão (5).	29
Figura 4. Matriz exopolimérica envolvendo a levedura <i>C. albicans</i>	29
Figura 5. Planta <i>A. urundeuva</i> (Allemão) Engl.	33
Figura 6. Gotículas formadas em uma microemulsão água óleo (A/O) e óleo água (O/A) devido a presença de surfactante e co-surfactante, os quais estão posicionados de acordo sua afinidade com a fase interna/externa.	35
Figura 7. Etapas utilizadas no fracionamento do extrato hidroetanólico das folhas de <i>A. urundeuva</i> por partição líquido líquido (A) e extração em fase sólida (B) com posterior análise por cromatografia em camada delgada.	41
Figura 8. Esquema do ensaio anti-candidíase vulvovaginal.	52
Figura 9. Design da microplaca para o ensaio de microdiluição frente às células planctônicas de <i>C. albicans</i> e <i>C. glabrata</i>	53
Figura 10. Ensaio <i>checkerboard</i> para amostras em combinação frente a <i>C. albicans</i> e <i>C. glabrata</i>	55
Figura 11. Fluxograma de fracionamento do extrato hidroetanólico das folhas de <i>A. urundeuva</i>	58
Figura 12. Cromatoplasmas do extrato (Ext), fase aquosa (FA) e fase orgânica (FO) na menor e maior escala, respectivamente.	59
Figura 13. Cromatoplasmas do extrato, FO, FA e frações obtidas da EFS 1, após revelação com anisaldeído sulfúrico 10 % e cloreto férrico 1%, respectivamente.	60
Figura 14. Cromatoplasmas do extrato, FO, FA e frações obtidas da EFS 2, após revelação com anisaldeído sulfúrico 10% e cloreto férrico 1%, respectivamente.	61
Figura 15. Cromatoplasmas do extrato, FO, FA e frações obtidas da EFS 3, após revelação com anisaldeído sulfúrico 10% e cloreto férrico 1%, respectivamente.	62
Figura 16. Cromatoplasma do extrato, FO, FA, frações obtidas da EFS 3 e padrão de ácido gálico após revelação com cloreto férrico 1%.	63

Figura 17. Espectros na região do UV do extrato bruto, FA, fração 1 e padrão de ácido gálico.	64
Figura 18. Espectro na região do UV da fração 2.	64
Figura 19. Espectros na região do UV das frações 4, 5 e 6.	65
Figura 20. Espectro na região do UV da fração 3.	65
Figura 21. Espectro na região do UV da FO.	65
Figura 22. Espectro na região do UV da fração 7.	66
Figura 23. Microplaca após revelação com TTC (2%), na qual os poços incolores apresentam ausência de crescimento fúngico e os de coloração vermelha, presença de crescimento fúngico.	68
Figura 24. Cromatograma representando o perfil do extrato e da fração 1 [Coluna Analítica Phenomenex® Luna C ₁₈ , 250 x 4,60 mm de diâmetro interno; Solvente A: H ₂ O + 0,01% TFA; Solvente B: metanol + 0,01% TFA. Gradiente de 5-50% de B por 30 min, de 50-100% de B por 5 min e 100% de B por 10 min; vazão de 1 mL/min; λ = 272 nm].	69
Figura 25. Espectros na região do UV dos picos 1-4 do extrato e da fração 1; λ = 272 nm. ..	70
Figura 26. Cromatograma da fração 1 obtida em CLAE-UV no modo preparativo [Coluna Zorbax® Eclipse XDB C ₁₈ , 250 x 21,20 mm, 7 μ m; Gradiente de 15-60% de metanol:água por 60 min; vazão de 8 mL/min; λ = 272 nm].	71
Figura 27. Espectro de massa (micrOTOFTM- Q II) da subfração 7.	73
Figura 28. Estrutura química do galato de etila.	74
Figura 29. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CD ₃ OD) da subfração 7.	75
Figura 30. Espectro de RMN ¹³ C (300 MHz, CD ₃ OD) da subfração 7.	76
Figura 31. Estrutura química do 1,2,3,4,6-penta-O-galoil- β -D-glicose (PGG).	77
Figura 32. Cromatograma do extrato (<i>clean up</i> com MeOH) obtido em CLAE-DAD no modo analítico [Coluna Phenomenex® Synergi Hydro C ₁₈ , 250 x 4,6 mm, 4 μ m; Solvente A: H ₂ O + 0,01% TFA; Solvente B: metanol + 0,01% TFA. Gradiente de 5-50% de B por 30 min, de 50-100% de B por 5 min e 100% de B por 10 min; vazão de 1 mL/min; λ = 280 nm].	78
Figura 33. Cromatograma do extrato obtido em CLAE-DAD no modo analítico [Coluna Phenomenex® Synergi Hydro C ₁₈ , 250 x 4,6 mm, 4 μ m; Gradiente de 0-15% de ACN (15 min), 15-20% ACN (30 min), 20-30% ACN 30-100% (5 min), 100% ACN (5 min); vazão de 1 mL/min; λ = 280 nm].	79

Figura 34. Cromatograma do extrato obtido em CLAE-DAD no modo analítico [Coluna Phenomenex® Synergi Hydro C ₁₈ , 250 x 4,6 mm, 4 µm; Gradiente de 0-15% de ACN (15 min), 15-20% ACN (30 min), 20-30% ACN (30 min), 30-100% (5 min), 100% ACN (5 min); vazão de 1 mL/min; λ= 280 nm].	80
Figura 35. Cromatograma do extrato + padrão de ácido gálico em CLAE-UV no modo analítico [Coluna Hypersil Gold® C ₁₈ , 250 x 4,6 mm, 5 µm; Solvente A: H ₂ O; Solvente B: ACN. Gradiente de 15-60% de B por 60 min; vazão de 0,4 mL/min; λ= 280 nm].	80
Figura 36. Cromatograma do extrato + padrão de galato de metila obtido em CLAE-DAD no modo analítico [Coluna Phenomenex® Synergi Hydro C ₁₈ , 250 x 4,6 mm, 4 µm; Solvente A: H ₂ O + 0,01% TFA; Solvente B: metanol + 0,01% TFA. Gradiente de 5-50 % de B por 30 min, de 50-100% de B por 5 min e 100% de B por 10 min; vazão de 1 mL/min; λ= 280 nm].	81
Figura 37. Estrutura química do ácido gálico.	81
Figura 38. Estrutura química do galato de metila.	81
Figura 39. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CD ₃ OD) do galato de metila.	82
Figura 40. Espectro de RMN ¹³ C (300 MHz, CD ₃ OD) do galato de metila.	83
Figura 41. Cromatograma do extrato + padrão de galato de etila obtido em CLAE-DAD no modo analítico [Coluna Phenomenex® Synergi Hydro C ₁₈ , 250 x 4,6 mm, 4 µm; Solvente A: H ₂ O + 0,01% TFA; Solvente B: metanol + 0,01% TFA. Gradiente de 5-50% de B por 30 min, de 50-100% de B por 5 min e 100% de B por 10 min; vazão de 1 mL/min; λ= 280 nm].	83
Figura 42. Curvas analíticas para as soluções padrão de ácido gálico, galato de metila e galato de etila utilizadas na quantificação de substâncias do extrato das folhas de <i>A. urundeuva</i> .	86
Figura 43. Porcentagem de viabilidade de <i>Artemia salina</i> L. em relação a concentração das amostras utilizadas.	95
Figura 44. Análise microscópica de <i>C. albicans</i> não tratada (A e C) ou tratada (B e D) com o extrato livre na concentração de CIM ₉₀ (250 µg/mL) após 24 horas em aumento de 10 (A/B) e 40 (C/D) x, respectivamente.	100
Figura 45. Análise microscópica de <i>C. albicans</i> não tratada (A e C) ou tratada (B e D) com o extrato livre na concentração de CIM ₉₀ (250 µg/mL) após 48 horas em aumento de 10 (A/B) e 40 (C/D) x, respectivamente.	100

Figura 46. Análise microscópica de <i>C. glabrata</i> não tratada (A e C) ou tratada (B e D) com o extrato livre na concentração de CIM ₉₀ (31.25 µg/mL) após 24 horas em aumento de 10 (A/B) e 40 (C/D) x, respectivamente.	101
Figura 47. Análise microscópica de <i>C. glabrata</i> não tratada (A e C) ou tratada (B e D) com o extrato livre na concentração de CIM ₉₀ (31.25 µg/mL) após 48 horas em aumento de 10 (A/B) e 40 (C/D) x, respectivamente.	101
Figura 48. Ensaio anti-biofilme revelado com XTT para a levedura <i>C. albicans</i> SC5314, onde os poços que permaneceram incolores apresentam ausência de viabilidade celular e, os que alteraram sua coloração para o laranja, presença de viabilidade celular.	106
Figura 49. Mapa de cores do galato de etila em combinação com anfotericina B em <i>Candida glabrata</i> ATCC 2001.....	108
Figura 50. Mapa de cores do extrato livre em combinação com a anfotericina B em <i>Candida albicans</i> SC5314.....	109
Figura 51. Mapa de cores do extrato livre em combinação com fluconazole em <i>Candida albicans</i> SC5314.....	109
Figura 52. Mapa de cores do extrato livre em combinação com fluconazol em <i>Candida glabrata</i> ATCC 2001.....	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições utilizadas durante a partição líquido-líquido (PLL) e a extração em fase sólida (EFS) em diferentes escalas.	40
Tabela 2. Gradientes utilizados durante as extrações em fase sólida (EFS) para a obtenção das frações.....	42
Tabela 3. Fases móveis testadas para cromatografia em camada delgada (CCD).....	43
Tabela 4. Relação de cepas clínicas de <i>Candida</i> sp. com perfil de susceptibilidade e padrões clínicos.....	46
Tabela 5. Grupos de experimentação para o ensaio anti-candidíase vulvovaginal (CVV).	51
Tabela 6. Valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) das amostras vegetais através da revelação com TTC (2%).	67
Tabela 7. Massa e rendimento das subfrações obtidas da fração 1.	71
Tabela 8. Valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) das subfrações através da revelação com TTC (2%).....	72
Tabela 9. Dados espectrométricos de RMN obtidos para a subfração 7 a 300 MHz para ^1H e ^{13}C	74
Tabela 10. Valores de RMN de ^1H da substância X (CD_3OD), de acordo com Carvalho (2013).	77
Tabela 11. Dados espectrométricos de RMN obtidos para o galato de metila a 300 MHz para ^1H e ^{13}C	82
Tabela 12. Valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) do extrato e substâncias identificadas através da revelação com TTC (2%).	84
Tabela 13. Dados obtidos na quantificação de ácido gálico no extrato hidroetanólico das folhas de <i>A. urundeuva</i>	86
Tabela 14. Dados obtidos na quantificação de galato de metila no extrato hidroetanólico das folhas de <i>A. urundeuva</i>	87
Tabela 15. Dados obtidos na quantificação de galato de etila no extrato hidroetanólico das folhas de <i>A. urundeuva</i>	87
Tabela 16. Teor das substâncias identificadas no extrato hidroetanólico das folhas de <i>A. urundeuva</i>	87
Tabela 17. Efeito inibitório do ácido gálico, galato de metila e galato de etila combinados entre si em <i>Candida albicans</i> SC5314 e <i>Candida glabrata</i> ATCC 2001.	88

Tabela 18. Valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) do extrato, subfração 7 e substâncias isoladas através da revelação com TTC (2%).	90
Tabela 19. Valores das médias e desvio-padrão dos tamanhos das partículas e IPD para as MEs base A e B e para os extratos incorporados na microemulsão (ME) após o preparo.....	92
Tabela 20. Resultados da CIM ($\mu\text{g/mL}$) frente às cepas de <i>Candida</i> sp, do IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) sobre as linhagens celulares VERO e MRC-5 e o valor do IS da razão entre esses dois resultados do extrato hidroetanólico das folhas de <i>A. urundeuva</i> livre ou na microemulsão (ME).	93
Tabela 21. Quantificação da carga fúngica obtida nos grupos.	96
Tabela 22. Efeito inibitório ($\mu\text{g/mL}$) do galato de etila, extrato livre e incorporado, e o fármaco convencional fluconazol contras os isolados clínicos de <i>Candida albicans</i>	98
Tabela 23. Efeito inibitório ($\mu\text{g/mL}$) do galato de etila, extrato livre e incorporado, e padrão antifúngico fluconazol em isolados clínicos TW e mutantes de cepas ganhadoras de função de <i>C. albicans</i>	102
Tabela 24. Efeito inibitório ($\mu\text{g/mL}$) do galato de etila, extrato livre e incorporado e padrões antifúngicos fluconazol e equinocandina contra isolados clínicos de <i>C. glabrata</i>	104
Tabela 25. Efeito ($\mu\text{g/mL}$) do galato de etila, extrato livre e incorporado na inibição da formação e em biofilmes pré-formados de <i>C. albicans</i> and <i>C. glabrata</i>	106
Tabela 26. Efeito inibitório do galato de etila, extrato livre e incorporado em combinação com a anfotericina B, fluconazol e equinocandina em <i>C. albicans</i> SC5314. Números dados em parênteses indicam ICIF para combinações que representam sinergismo.....	108
Tabela 27. Efeito inibitório do galato de etila, extrato livre e incorporado em combinação com a anfotericina B, fluconazol e equinocandina em <i>C. glabrata</i> ATCC 2001. Números dados em parênteses indicam ICIF para combinações que representam sinergismo.	108
Tabela 28. Concentrações ($\mu\text{g/mL}$) estabelecidas para o extrato livre e fluconazol frente às cepas de <i>C.albicans</i> SC5314 e <i>C. glabrata</i> ATCC 2001 utilizadas no ensaio de desenvolvimento da resistência.	110
Tabela 29. Efeito inibitório ($\mu\text{g/mL}$) do galato de etila, extrato livre e incorporado contra <i>Cryptococcus neoformans</i> (H99, WSA and R4247) e <i>Cryptococcus gattii</i> (R265).	111
Tabela 30. Concentração do extrato livre ($\mu\text{g/mL}$) contra múltiplas espécies fúngicas para inibir 50% e 100% viabilidade celular.	112

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ASD	Ágar sabouraud dextrose
CAV3	Cepa clínica de <i>C. albicans</i>
CCD	Cromatografia em camada delgada
CD ₃ COCD ₃	Acetona deuterada
CFM	Concentração fungicida mínima
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CGV3	Cepa clínica de <i>C. glabrata</i>
CIF	Concentração inibitória fracionada
CIM	Concentração inibitória mínima (Sigla em inglês: MIC)
CL ₅₀	Concentração letal mediana (Sigla em inglês: LD ₅₀)
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência (Sigla em inglês: HPLC)
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CPA	<i>Ciclophosphamide</i> (ciclofosfamida)
CSD	Caldo sabouraud dextrose
CVV	Candidíase vulvovaginal
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>
DST	Doença sexualmente transmissível
EFS	Extração em fase sólida
EM	Espectroscopia de Massa (Sigla em inglês: MS)
FA	Fase aquosa
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FE	Fase estacionária
FM	Fase móvel
FO	Fase orgânica

FOI	Fase oleosa
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IC ₅₀	Índice de Citotoxicidade
ICIF	Índice da concentração inibitória fracionada (Sigla em inglês: FICI)
IPD	Índice de Polidispersidade
IS	Índice de Seletividade
LD ₅₀	<i>Lethal Dose</i>
ME	Microemulsão
MeOH	Metanol
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
MOPS	Ácido 3-[N-morfino] propanossulfônico
MS	<i>Mass spectroscopy</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (tampão fosfato)
PGG	1,2,3,4,6-penta-O-galoil- β -D-glicose
PLL	Partição Líquido-Líquido
R _f	Fator de retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RP	<i>Reverse-phase</i> (fase reversa)
rpm	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
T	Tensoativo
TFA	Ácido trifluoroacético (<i>Trifluoroacetic acid</i>)
TMS	Tetrametilsilano
t _R	Tempo de retenção
TTC	Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UTI	Unidades de Terapia Intensiva
UV	Ultravioleta
v	volume
XTT	2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida
YPD	<i>Yeast extract peptone dextrose</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1. Infecções fúngicas e o gênero <i>Candida</i> sp.....	22
2.2. A candidíase vulvovaginal (CVV).....	24
2.3. <i>Candida albicans</i>	24
2.4. <i>Candida glabrata</i>	26
2.5. Tratamento da CVV e resistência aos antifúngicos convencionais	26
2.6. Biofilmes.....	28
2.7. Plantas medicinais como novas fontes antimicrobianas	30
2.7.1. <i>Astronium urundeuva</i>	32
2.8. Sistemas nanoestruturados	34
3. OBJETIVOS.....	37
3.1. Objetivo geral	37
3.2. Objetivos específicos	37
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1. Obtenção e procedência do extrato vegetal	38
4.2. Fracionamento do extrato vegetal.....	39
4.2.1. Partição Líquido-Líquido (PLL)	40
4.2.2. Extração em Fase Sólida (EFS)	41
4.2.3. Análise por cromatografia em camada delgada (CCD) do extrato vegetal, fases obtidas da PLL e frações obtidas por EFS.....	42
4.2.4. Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta (UV).....	43
4.2.5. Análise por CLAE-DAD do extrato vegetal e fração mais ativa no modo analítico	43
4.2.6. Isolamento de substâncias a partir da fração mais ativa com o emprego de CLAE preparativo de fase reversa.....	44
4.2.7. Determinação estrutural das substâncias da subfração mais ativa	44
4.2.8. Quantificação das substâncias identificadas no extrato das folhas de <i>A. urundeuva</i>	45

4.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente às cepas de <i>C. albicans</i> e <i>C. glabrata</i>	45
4.4. Incorporação das amostras vegetais no sistema nanosestruturado	46
4.4.1. Caracterização estrutural das microemulsões.....	47
4.5. Ensaio de toxicidade.....	48
4.5.1. Determinação da citotoxicidade em linhagens celulares	48
4.5.2. Avaliação da toxicidade aguda frente à <i>Artemia salina</i> L. (Artemiidae). ..	49
4.6. Ensaio <i>in vivo</i>	50
Experimentos realizados durante o Doutorado Sanduíche na	52
The University of Texas at San Antonio (UTSA), Texas, Estados Unidos.....	52
4.7. Eficácia contra coleção de cepas e isolados clínicos de <i>Candida albicans</i> e <i>Candida glabrata</i>	52
4.8. Atividade contra biofilmes.....	53
4.9. Estudos de combinação com os fármacos antifúngicos convencionalmente utilizados	54
4.10. Experimento de passagem seriada para avaliar o potencial para o desenvolvimento de resistência	56
4.11. Eficácia contra cepas de <i>Cryptococcus neoformans</i> e <i>Cryptococcus gattii</i>	56
4.12. Espectro de ação contra múltiplas espécies fúngicas	56
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1. Análise por CCD após PLL	58
5.2. Análise por CCD após Extração em Fase Sólida.....	59
5.3. Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta	63
5.4. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato, fases e frações frente cepas padrão e isolados clínicos de <i>C. albicans</i> e <i>C. glabrata</i>	66
5.5. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – DAD do extrato e da fração 1... ..	68
5.6. Isolamento de substâncias a partir da fração 1 com o emprego de CLAE preparativo de fase reversa	71
5.7. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das subfrações da fração 1	72
5.8. Determinação estrutural da subfração 7.....	73
5.8.1. Espectrometria de massa da subfração 7.....	73

5.8.2. Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C da subfração 7.....	74
5.9. Identificação das demais substâncias majoritárias do extrato	76
5.10. Quantificação das substâncias identificadas no extrato das folhas de <i>A. urundeuva</i>	85
5.11. Estudos de combinação entre as substâncias identificadas	88
5.12. Incorporação no sistema nanoestruturado	89
5.13. Concentração fungicida mínima (CFM)	91
5.14. Caracterização estrutural das microemulsões	92
5.15. Ensaio de Toxicidade	93
5.15.1. Determinação da citotoxicidade em linhagens celulares	93
5.15.2. Avaliação da toxicidade aguda frente à <i>Artemia salina</i> L. (Artemiidae)... ..	94
5.16. Ensaio <i>in vivo</i>	96
5.17. Amostras utilizadas	97
5.18. Eficácia frente coleção de cepas e isolados clínicos de <i>Candida albicans</i> e <i>Candida glabrata</i>	98
5.19. Atividade contra biofilmes	105
5.20. Estudos de combinação da amostra vegetal com os antifúngicos convencionais	107
5.21. Análise do potencial do desenvolvimento de resistência	110
5.22. Eficácia contra cepas de <i>Cryptococcus</i> sp.....	111
5.23. Espectro de ação contra múltiplas espécies fúngicas	112
6. CONCLUSÕES	115
REFERÊNCIAS	118

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Candida* sp. compreende cerca de 150 espécies que podem habitar diversos ambientes corporais, como por exemplo, cavidade bucal, orofaringe, secreções brônquicas, dobras da pele, fezes, urina e vagina. O processo de colonização por leveduras deste gênero nas mucosas de todos os seres humanos ocorre durante ou logo após o nascimento e, são capazes de se adaptar rapidamente ao corpo humano e colonizá-lo sem causar candidíase, assim conhecida a doença causada por leveduras deste gênero. A doença somente irá desenvolver quando houver um desequilíbrio na relação homem *versus* micro-organismo, fazendo com que sejam classificadas como leveduras oportunistas (ACHKAR; FRIES, 2010; ÁLVARES et al., 2007).

A doença pode ser classificada em candidíase cutânea, mucosa, cutaneomucosa ou visceral de acordo com o local atingido, sendo a cavidade oral e a vagina, os locais considerados como de maior frequência devido sua temperatura e umidade favoráveis (BARBEDO; SGARBI, 2010). Dentro da candidíase cutaneomucosa, existem as geniturinárias ou não geniturinárias e, dentro das geniturinárias, a candidíase vulvovaginal (CVV) é considerada a mais comum ao atingir aproximadamente 75% das mulheres pelo menos uma vez durante a vida (MARRAZO, 2003) e, nos casos de maior frequência (pelo menos 4 vezes durante o período de 1 ano), a CVV pode ser classificada como recorrente. A CVV pode ser definida como a presença de sinais e sintomas inflamatórios que acometem vagina e vulva, causados pela presença evidenciada desse micro-organismo (ACHKAR; FRIES, 2010).

Apesar dos avanços científicos direcionados à terapia medicamentosa, cresce desenfreadamente o número de cepas que apresentam sensibilidade reduzida aos agentes antifúngicos já disponíveis no mercado, gerando como consequência um aumento no custo e mortalidade nas unidades de terapia intensiva (UTI) que apresentam pacientes infectados com cepas resistentes (BARAI et al., 2010). Nos Estados Unidos da América, o diagnóstico e tratamento da CVV geram custos anuais de um bilhão de dólares (BARBOSA et al., 2012).

Diante do surgimento de cepas cada vez mais resistentes juntamente com a importância da CVV se faz necessária a busca por substâncias que apresentem eficácia contra as cepas com sensibilidade reduzida. As fontes naturais, como por exemplo, as plantas medicinais, são popularmente utilizadas na terapia de diversas doenças. Aliado ao uso popular, os estudos voltados para as plantas com propriedades medicinais permitiu a descoberta de inúmeras substâncias de origem vegetal que apresentem alguma propriedade

terapêutica (COSTA et al., 2010; BRESOLIN; FILHO, 2010). As propriedades fitoquímicas e biológicas das plantas medicinais estimularam uma maior investigação sobre os compostos biologicamente ativos. Sabe-se que muitos metabólitos secundários presentes em extratos vegetais desempenham várias funções biológicas, entre elas a antimicrobiana.

De maneira a aprofundar a pesquisa com plantas medicinais e contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos, um grupo composto por vários pesquisadores de diversos laboratórios propuseram o projeto “Fitoterápicos padronizados para o tratamento de doenças crônicas” (Biota/FAPESP). Este projeto encontra-se em consonância com a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos do Ministério da Saúde e, dentre as plantas estudadas, encontra-se o *Astronium urundeuva* (Anacardiaceae), que apresenta diversas propriedades terapêuticas.

Um estudo realizado em nosso grupo de pesquisa (Laboratório de Fisiologia dos Microrganismos – UNESP Araraquara) avaliou a atividade antimicrobiana de extratos vegetais de caule e folhas de três espécies de *Astronium* sp. (*A. fraxinifolium*, *A. graveolens* e *A. urundeuva*) livres (solubilizadas em DMSO 10%) ou incorporados em uma microemulsão frente aos micro-organismos: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella setubal* (ATCC 19196), *Helicobacter pylori* (ATCC 43504) e *Candida albicans* (ATCC 18804). Dentre os resultados apresentados pelas espécies vegetais, destacaram-se aquelas apresentados pela espécie das folhas de *A. urundeuva* frente a *C. albicans*, na qual sua atividade antifúngica foi ainda mais potencializada após incorporação na microemulsão desenvolvida (CIM₉₀ de 125 para 15,62 µg/mL). Além disso, foi realizado o ensaio *in vivo* a fim de avaliar o potencial anti-candidíase vulvovaginal do extrato mais promissor (folhas de *A. urundeuva*), no qual os resultados obtidos confirmaram os resultados *in vitro*, uma vez que o número de UFC/mL apresentado pelo grupo de animais tratado com o extrato incorporado foi reduzido em menor tempo em relação grupo tratado com o extrato livre (BONIFÁCIO et al., 2015). Estimulados por esses resultados, esse trabalho se propôs a aprofundar os estudos direcionados a atividade antifúngica desta espécie vegetal de maneira a identificar os constituintes majoritários do extrato ou até mesmo isolar as substâncias responsáveis pela atividade antifúngica, enriquecendo o arsenal terapêutico de agentes com propriedades antifúngicas. Além disso, não são relatadas na literatura artigos que tratam da identificação de substâncias das folhas de *A. urundeuva* que são responsáveis por esta propriedade anti-*Candida* sp, o que permitirá ineditismo de nossos resultados.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Infecções fúngicas

Diante do elevado número de doenças que acometem o ser humano, principalmente aquelas capazes de debilitar o sistema imune do hospedeiro, maior atenção têm sido dada as doenças causadas por fungos, uma vez que a redução de linfócitos CD4⁺ predispõe o paciente a diversas infecções fúngicas. Um exemplo bastante comum são os pacientes infectados com o *Human Immunodeficiency Virus* (HIV), os quais apresentam quadros frequentes de infecções fúngicas (BROWN et al., 2012; ARMSTRONG-JAMES et al., 2014; NETEA et al., 2015).

Ao atingir uma população crescente de pacientes imunocomprometidos, as doenças causadas por fungos estão sendo consideradas uma ameaça global. As infecções fúngicas oportunistas são relatadas desde o início de 1980, quando foram reportados os primeiros casos de *Acquired Immune Deficiency Syndrome* (AIDS) em São Francisco e em Nova York. Dentre os 400 casos reportados de mortes causadas por infecções fúngicas em pacientes com HIV/AIDS, 70% dessas foram inicialmente causadas por *Pneumocystis pneumonia*. Recentemente, os quadros de meningite causada por criptococose são responsáveis pela maioria das mortes relacionadas a infecções fúngicas em pacientes com HIV (ARMSTRONG-JAMES et al., 2014).

Além das doenças causadoras de imunossupressão, existem diversos outros fatores que podem contribuir para o surgimento das infecções fúngicas, como por exemplo, o uso de imunossupressores utilizados no tratamento de outros tipos de doenças. Quadros de neutropenia onde o número de neutrófilos/mL é inferior a 500 por um período superior a 10 dias, malignidades hematológicas, transplantes, permanência prolongada em unidades de terapia intensiva (UTI), tratamento com quimioterápicos e outros procedimentos médicos invasivos também são alguns fatores capazes de facilitar o surgimento de tais infecções (BADIEE; HASHEMIZADEH, 2014). OBS

Dentre as diversas infecções fúngicas, destacam-se aquelas causadas por leveduras do gênero *Candida* sp. Cerca de 150 espécies deste gênero normalmente habitam os mais diversos ambientes corporais, como a cavidade bucal, orofaringe, secreções brônquicas, dobras da pele, fezes, urina e vagina. Dentre todas as espécies, pelo menos quinze são capazes de desenvolver a candidíase, assim conhecida à doença causada por leveduras deste gênero. Contudo, mais de 90% de todos os casos da doença envolvem cinco espécies principais: *C.*

albicans, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei* (ARAÚJO; HENRIQUES; SILVIA, 2016; PAPPAS et al., 2016).

É no decorrer ou logo após o nascimento que as leveduras deste gênero iniciam o processo de colonização nas mucosas de todos os seres humanos, como pele, trato gastrointestinal e reprodutivo (ACHKAR; FRIES, 2010). Por serem consideradas leveduras comensais, são capazes de se adaptarem rapidamente ao corpo humano e colonizá-lo sem causar o desenvolvimento de alguma doença em condições fisiológicas normais, ou seja, a candidíase somente irá se desenvolver quando houver um desequilíbrio entre o hospedeiro e este micro-organismo, sendo assim considerada uma infecção fúngica oportunista (MAYER; WILSON; HUBE, 2013; FERREIRA et al., 2015). Quando não oriundas da microbiota, as candidíases são consideradas exógenas, e muitas vezes classificadas até mesmo como uma doença sexualmente transmissível (DST) por alguns autores (BARBEDO; SGARBI, 2010, GUNTHER et al., 2014).

A classificação da doença pode variar de acordo com o local atingido. Quando capaz de atingir a corrente sanguínea (candidemia) e se disseminar para outros locais, a candidíase é considerada invasiva e, quando acomete apenas pele e/ou mucosa, superficial. Nos Estados Unidos da América (EUA), o gênero *Candida* sp. encontra-se entre os cinco patógenos mais envolvidos nos casos de infecções da corrente sanguínea, chegando a causar cerca de 8-10% das infecções nosocomiais (YAPAR, 2014). Cerca de 92% de todos os casos de candidemia são causados pelas cinco espécies já anteriormente citadas (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*), as quais podem distribuir-se de maneira diferente de acordo com a área geográfica e indivíduo e, embora a espécie *C. albicans* seja a mais frequentemente encontrada, há diferenças consideráveis nos casos envolvendo as espécies *C. glabrata* e *C. parapsilosis*. Os EUA e a maioria dos países europeus apresentam um maior número de casos envolvendo a espécie *C. glabrata* enquanto que Brasil e Espanha destacam quadros causados pela espécie *C. parapsilosis*. De uma maneira mais global, observa-se uma redução dos casos envolvendo a espécie *C. albicans*, enquanto que um aumento gradativo daqueles causados pela espécie *C. parapsilosis*. As taxas de mortalidade atribuídas a candidemia encontram-se em torno de 15-35% em adultos e 10-15% em neonatos e, apresentam custos de hospitalização de aproximadamente 40.000 dólares a cada episódio (GUINEA, 2014). No Brasil, os quadros de candidemia chegam a ser em média de 12 a 15 vezes maiores em relação a outros países como Estados Unidos (YAPAR, 2014).

2.2. A candidíase vulvovaginal (CVV)

Os ambientes mais quentes e úmidos, como a cavidade oral e a vagina, são considerados os locais preferidos pelas espécies do gênero *Candida* sp. (SARDI et al., 2013). A candidíase cutaneomucosa pode ser dividida em não genital ou geniturinária. Entre as geniturinárias, a CVV é considerada a mais comum e acomete cerca de 75 % das mulheres adultas pelo menos uma vez durante a vida, podendo ou não apresentar episódios de recorrência (BONIFÁCIO et al., 2015; RAMOS et al., 2015; RATTI et al., 2015; SHERRY et al., 2017), enquanto que a candidúria, apesar de poder atingir ambos os sexos, costuma ser mais frequente em pacientes imunocomprometidos e neonatos. A CVV pode ser definida como os sinais e sintomas inflamatórios causados pela presença evidenciada desse micro-organismo e é a segunda causa considerada mais frequente de infecção genital, perdendo apenas para a vaginose bacteriana (BARBOSA et al., 2012; VAN SCHALKWYK et al., 2015). Quando esse quadro ocorre pelo menos quatro vezes durante o período de 1 ano, a candidíase é classificada como recorrente (CVVR) e, embora a *C. albicans* ainda seja considerada a espécie mais comum, o número de casos de CVVR causada por outras espécies ditas não-*albicans* vem aumentando (ACHKAR; FRIES, 2010; SOBEL, 2016).

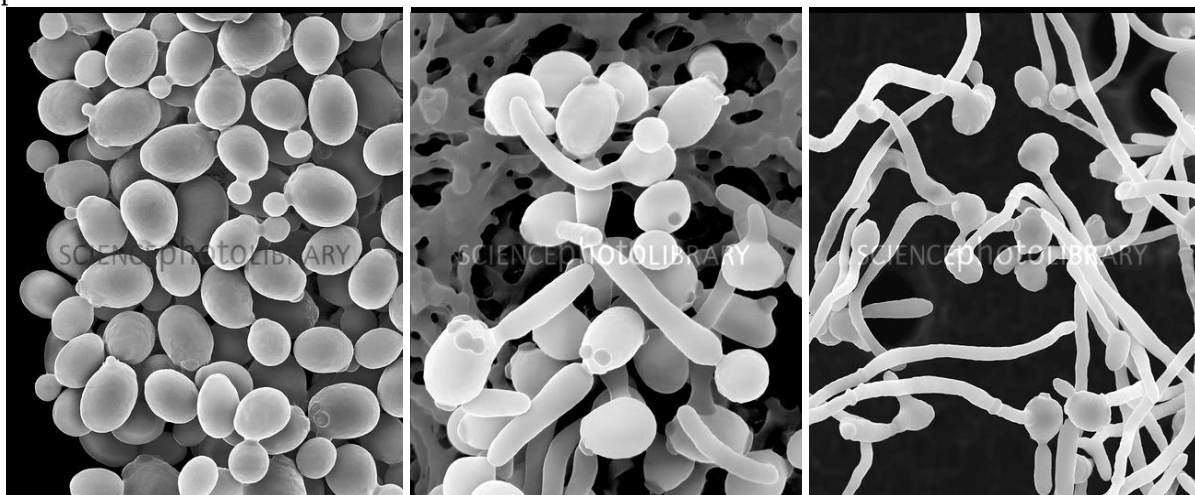
2.3. *Candida albicans*

Algumas espécies de *Candida* sp. limitam-se a determinadas regiões, enquanto outras, como a *C. albicans*, distribuem-se amplamente, além de ser considerada a espécie com maior relevância no que se diz respeito à taxa de prevalência em condições de normalidade e doença (MAYER; WILSON; HUBE, 2013; GARCIA-CUESTA; SARRION-PÉREZ; BAGÁN, 2014), sendo que cerca de 60% dos isolados de amostras clínicas mostram infecções causadas por esta espécie (BARBEDO; SGARBI, 2010).

Existem alguns fatores que são considerados imprescindíveis para o comportamento patogênico e a capacidade de invadir tecidos da espécie *C. albicans*. A morfogênese ou dimorfismo celular é a capacidade que esta espécie tem de se apresentar tanto na forma leveduriforme (uma única célula) quanto na forma de hifas e/ou pseudohifas (Figura 1). Alguns estudos relatam a presença de ambas as formas no interior de lesões, mas comprovam que mutantes capazes de se apresentar nas duas formas apresentam um maior grau de virulência em relação aos mutantes exclusivamente formadores de leveduras ou hifas. Além disso, quando o sistema imune do hospedeiro atua de maneira a combater determinada infecção fúngica e os macrófagos assumem seu papel de fagocitar as leveduras, estas são

capazes de lisar a célula fagocítica através da produção de filamentos. Portanto, o dimorfismo celular pode ser considerado uma estratégia para garantir a sobrevivência do fungo em condições não favoráveis (MUKAREMERA et al., 2017).

Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura de *C. albicans* na forma de levedura, hifas e/ou pseudohifas.



Fonte: Science Photo Library, 2017a, b, c.

A capacidade da levedura se aderir tanto em superfícies bióticas como abióticas aumenta ainda mais seu fator de virulência. Ao se aderir, através proteínas de superfície celular especializadas, as adesinas, a levedura é capaz de invadir e se disseminar pelo organismo (CHAFFIN et al., 1998). A presença de receptores presentes na superfície da parede celular permite a interação com ligantes presentes em células hospedeiras e até mesmo em outras superfícies. Um exemplo é o receptor Hwplp, o qual se apresenta apenas nas superfícies de hifas e é capaz de se ligar ao epitélio (SHAH et al., 2014; ZHU; FILLER, 2010). Além disso, existem outros receptores, a exemplo do Eaplp, que apresentam maior afinidade a superfícies abióticas como ao poliestireno (FILLER et al., 2006).

Outro fator de virulência considerado essencial é a produção e secreção de enzimas hidrolíticas, as quais são capazes de beneficiar o fungo ao provocar danos teciduais no hospedeiro, facilitando sua disseminação e se protegendo do sistema imune do hospedeiro. As principais são as fosfolipases (hidrolisam as ligações de um ou mais ésteres de glicerofosfolipídeos, encontrados na membrana celular do hospedeiro), proteases (hidrolisam proteínas importantes do hospedeiro, como colágeno, imunoglobulinas, citocinas próinflamatórias) e lipases (hidrolisam os lipídeos do hospedeiro) (ARAÚJO; HENRIQUES; SILVIA, 2016; SACHIN; RUCHI; SANTOSH, 2012).

Entre os quadros de candidíase não genitais, a candidíase oral constitui a infecção fúngica mais frequente entre os pacientes imunocomprometidos, principalmente os infectados com HIV (ACHKAR; FRIES, 2010). Diversos estudos apontam que cerca de 90% dos indivíduos soropositivos apresentam candidíase orofaríngea pelo menos uma vez na vida (BARBEDO; SGARBI, 2010; GARCIA-CUESTA; SARRION-PÉREZ; BAGÁN, 2014). A candidíase cutaneomucosa crônica geralmente acontece quando a resposta imune mediada por células do hospedeiro encontra-se debilitada, enquanto que a candidíase vaginal crônica também pode ser desencadeada por alguns fatores exógenos, como o uso de determinados medicamentos, principalmente antibióticos e contraceptivos orais, gestação, atividade sexual, que causa traumas de mucosa e, uso contínuo de roupas apertadas (MARCHAIM et al., 2012; PEIXOTO et al., 2014).

2.4. *Candida glabrata*

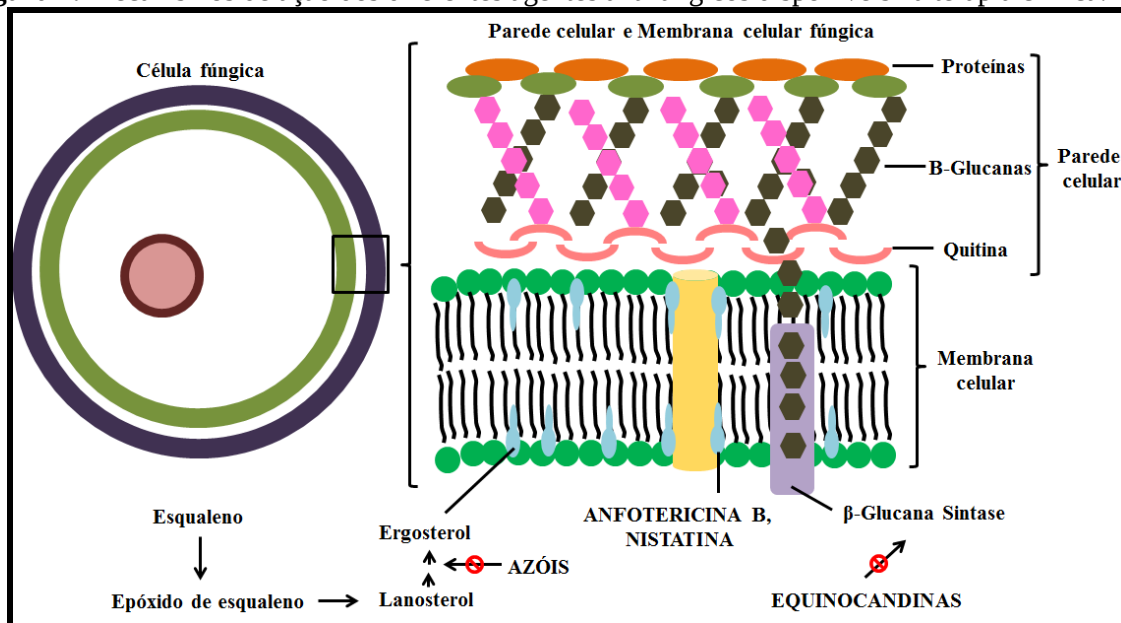
Dentre as espécies ditas não-*albicans*, a *C. glabrata* é considerada a segunda espécie mais envolvida nos quadros de CVV (KUCHARÍKOVÁ et al., 2011; LIM et al., 2012; MERESTEIN et al., 2013). Durante muito tempo esta espécie foi considerada uma levedura não patogênica da microbiota normal de indivíduos saudáveis e geralmente não associada a infecções severas. Entretanto, o uso de imunossupressores associado ao tratamento com antibióticos de amplo-espectro resultou em um maior número de infecções sistêmicas e de mucosa causadas por esta espécie (MORETTI et al., 2013). Em comparação a outras espécies não-*albicans*, a *C. glabrata* apresenta elevada taxa de mortalidade, sendo mais comumente encontrada em indivíduos adultos. Das infecções causadas por mais de uma espécie de *Candida* sp., especialmente na candidose oral, cerca de 70% envolve as espécies *C. glabrata* e *C. albicans* (ARAÚJO; HENRIQUES; SILVA, 2016; SILVA et al., 2012).

2.5. Tratamento da CVV e resistência aos antifúngicos convencionais

O tratamento das infecções fúngicas normalmente é feito com os derivados azólicos, os polienos e as equinocandinas, que possuem diferentes mecanismos de ação (Figura 2).

Os derivados azólicos apresentam como mecanismo de ação a inibição da enzima 14- α -lanosterol demetilase formada a partir do citocromo P450 e, por consequência, impede a formação do ergosterol, componente considerado essencial para a membrana da célula fúngica. Os principais representantes desta classe são: fluconazol, itraconazol, posaconazol, voriconazol e ravuconazol (triazóis) e o cetoconazol (imidazol).

Figura 2. Mecanismos de ação dos diferentes agentes antifúngicos disponíveis na terapia clínica.



Fonte: Autora.

A anfotericina B, antifúngico mais conhecido da classe dos polienos, é capaz de se ligar diretamente ao ergosterol tendo como consequência a perda de substâncias intracelulares importantes através dos poros que são formados. Este mecanismo irá causar morte celular, ou seja, a anfotericina B apresenta um efeito fungicida. A nistatina, também faz parte desta classe de antifúngicos, mas não pode ser utilizada sistemicamente devido ao seu elevado grau de toxicidade (COHEN, 2016). Em relação à seletividade da anfotericina B, pode-se dizer que esta pode causar danos nas células do hospedeiro, apresentando como um de seus principais efeitos colaterais a nefrotoxicidade (FALCI; ROSA; PASQUALOTTO, 2017).

Com o intuito de aumentar a seletividade às células de interesse (fúngicas), as equinocandinas (caspofungina) surgiram como a mais nova classe de antifúngicos, uma vez que atuam em componentes da parede celular exclusivamente de células fúngicas. Os antifúngicos desta classe são lipopeptídeos que apresentam como mecanismo de ação a interação com a β -(1,3) glucano sintase que, por consequência, inibe a síntese de β -(1,3) glucanas e perdendo a função da parede celular (ALEXANDER et al., 2013).

O tratamento da CVV geralmente é feito com derivados azólicos administrados por via oral ou tópica, contudo a exclusão dos fatores predisponentes e o tratamento adequado ao parceiro, quando transmitida sexualmente, tornam-se indispensáveis. Embora seja alto e cada vez mais moderno o avanço científico no que se diz respeito à terapia medicamentosa, a

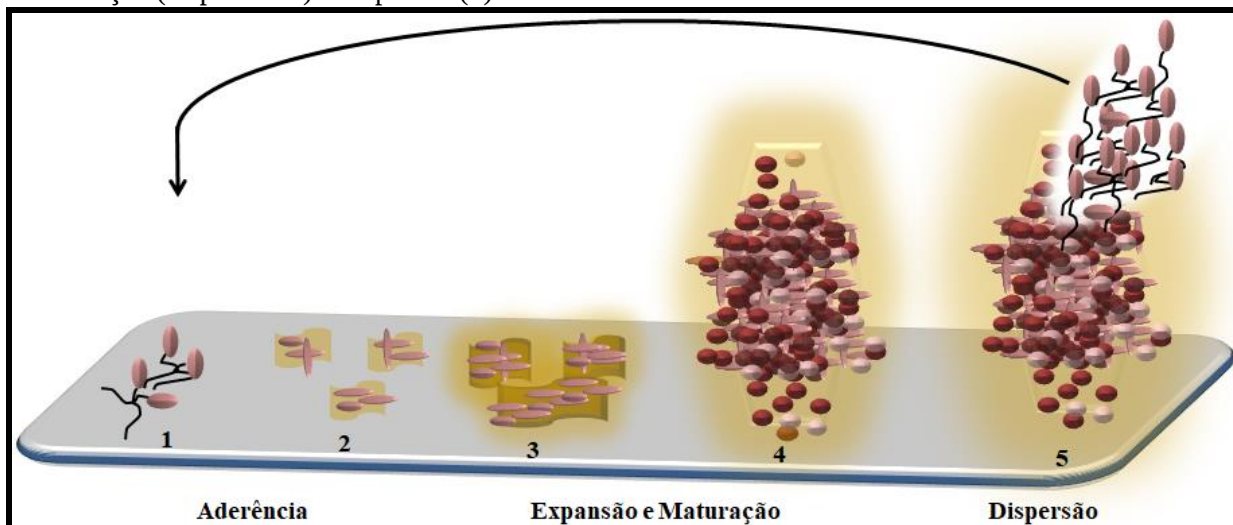
quantidade de espécies que apresentam sensibilidade reduzida a esta principal classe de antifúngicos ainda é considerada crescente e preocupante (LIU et al., 2014; FLOWERS et al., 2015; BOATTO et al., 2016). Além disso, os quadros de infecções causadas por cepas resistentes nas unidades de terapia intensiva são capazes de gerar um aumento do custo e mortalidade (BARAI et al., 2010; LUYT et al., 2014). Nos Estados Unidos da América, o diagnóstico e tratamento da CVV geram custos anuais de um bilhão de dólares (BARBOSA et al., 2012).

2.6. Biofilmes

Dentre os diversos fatores de virulência apresentados pelas cepas microbianas, os biofilmes são frequentemente relatados. Os biofilmes se diferem das células planctônicas (células em suspensão) por se apresentarem na forma de uma comunidade de células ligadas umas as outras na presença de uma matrix composta por substâncias exopoliméricas, a qual é produzida como uma estratégia de proteção contra os fatores externos, como a ação de agentes antimicrobianos por impedir sua penetração, ou do sistema imune do hospedeiro. Estima-se que mais de 80% das infecções microbianas são causadas pela presença de biofilmes e não apenas de células planctônicas (REICHHARDT; STEVENS; CEGELSKI, 2016; SOLL; DANIELS, 2016).

A Figura 3 mostra o processo de formação do biofilme, o qual envolve algumas etapas: primeiramente na fase inicial (0-11 horas), as células planctônicas se aderem a uma determinada superfície, seja ela biótica ou abiótica, através da produção de adesinas específicas, enzimas que reconhecem ligantes na superfície e são capazes de promover a adesão. Então, inicia-se o processo de desenvolvimento do biofilme (entre 12 e 30 horas), no qual as células começam a multiplicar, sendo algumas espécies capazes até mesmo de formar pseudo-hifas e hifas. Além disso, ocorre a produção de uma matriz composta por polissacarídeos e proteínas, a matriz exopolimérica, a qual mantém as células aderidas umas as outras. Quando o biofilme já se encontra maduro (38 a 72 horas), ou seja, quando a matriz polimérica já é capaz de embeber completamente todas as camadas de células que compõe o biofilme, ocorre a fase de dispersão, onde há o desprendimento de leveduras deste biofilme já formado, as quais são capazes de migrar a outro local e dar início ao processo de formação de um novo biofilme (RAMOS et al., 2018).

Figura 3. Processo de formação de um biofilme microbiano através aderência (etapas 1 e 2), expansão e maturação (etapas 3 e 4) e dispersão (5).



Fonte: Autora.

A matriz exopolimérica funciona como uma estrutura de proteção (Figura 4) e, além disso, através dos canais água formados entre as células, é possível que nutrientes sejam transportados e resíduos sejam eliminados, garantindo a manutenção desta estrutura tridimensional (RAMOS et al., 2018).

Figura 4. Matriz exopolimérica envolvendo a levedura *C. albicans*.



Fonte: Science Photo Library, 2017d.

Alguns autores demonstram que biofilmes em modelos *in vivo* além de atingirem a fase de maturação mais rapidamente, são mais espessos ($>100\ \mu\text{m}$) do que biofilmes formados em modelos *in vitro* ($24\text{-}450\ \mu\text{m}$). Células formadoras de biofilmes são mais virulentas em

relação às células não formadoras, e assim, apresentam uma maior resistência aos antifúngicos. Esta característica pode estar relacionada tanto a presença da matriz exopolimérica, a qual se apresenta como uma barreira física, impedindo a penetração do agente antifúngico, ou até mesmo através dos diversos mecanismos desenvolvidos pelo micro-organismo para permitir sua excreção, a exemplo das bombas de efluxo (MARTINEZ; FRIES, 2010).

Células planctônicas também pode apresentar resistência aos agentes antifúngicos. Dentre os principais motivos, encontra-se a expressão de bombas de efluxo presentes na membrana, transportadores tipo ABC e pelos facilitadores (DOMINGUEZ; ANDES, 2017). Os genes CDR1, CDR2 e MDR1 quando expressos em *C. albicans* permitem a formação de bombas de efluxo. No entanto, a expressão de tais genes pode ser mediada durante o processo de formação do biofilme (WHALEY et al., 2017; SOUZA et al., 2015).

Cerca de 50% de todos os casos de candidemia em UTI envolvem a presença de cateteres, principalmente o cateter venoso central, considerado o principal fator de risco em pacientes com o sistema imune debilitado. Além disso, alguns estudos demonstram que a dificuldade de tratamento e aumento da taxa de mortalidade envolve a formação de biofilmes por estas espécies fúngicas nessas superfícies (BOUZA; GUINEA; GUEMBE, 2015). OBS

2.7. Plantas medicinais como novas fontes antimicrobianas

A terapia antifúngica convencional, além apresentar uma série de efeitos colaterais, está sendo limitada pelo surgimento de cepas fúngicas cada vez mais resistentes, justificando significativamente a busca por novas moléculas com propriedades antifúngicas com maior espectro de ação, seletividade e menor toxicidade. Além disso, é extremamente desejável que além de apresentar atividade contra células planctônicas, tais moléculas possam também ser capazes de atuar em biofilmes já formados ou até mesmo inibir sua formação, uma vez que uma série de procedimentos médicos envolve a utilização de dispositivos internos por períodos relativamente longos. Alguns autores relatam forte atividade de determinado agente contra células planctônicas, mas pouca ou quase nenhuma contra biofilmes da mesma espécie, limitando ainda mais o arsenal terapêutico de produtos que sejam eficazes contra esta estrutura de resistência (GIRARDOT; IMBERT, 2016). Reichhardt, Stevens e Cegelshi (2016) publicaram um artigo de revisão no qual investigam minuciosamente os componentes da matriz exopolimérica de biofilmes fúngicos como uma estratégia para desenvolver antifúngicos que apresentem afinidade com algum componente e permitam uma maior

seletividade. Girardot e Imbert (2016) mencionam uma série de componentes antifúngicos de plantas medicinais de acordo com sua classificação fitoquímica, incluindo os terpenoides, compostos fenólicos, peptídeos, alcaloides e biossurfactantes.

Diante dessa situação, que vem se agravando de maneira significativa, a pesquisa por novas fontes que apresentem propriedades biológicas, incluindo as de origem natural como as plantas medicinais, vêm sendo cada vez mais incentivada por pesquisadores da área, os quais tem mostrado interesse não somente na caracterização biológica de extratos vegetais, mas também em sua análise fitoquímica de maneira a identificar a substância responsável pela propriedade de interesse (DAS et al, 2010; SAVOIA, 2012; KAUR; MONDAL, 2014).

Aliado a presença de uma ampla biodiversidade, pode-se dizer que o conhecimento popular foi e ainda é considerado a base na investigação de novas plantas com propriedades medicinais (OLIVEIRA et al., 2011; MAROYI, 2013), as quais apresentam diversas propriedades físico-químicas e biológicas mediadas pela presença de seus metabólitos secundários. Ainda assim, de acordo com dados presentes na literatura, é considerada baixa a porcentagem de plantas que são devidamente submetidas a estudos científicos, de modo a garantir eficácia e segurança durante sua utilização (BRESOLIN; FILHO, 2010; PEREIRA; CARDOSO, 2012; NASRI; SHIRZAD, 2013).

O processo de descoberta das propriedades biológicas das plantas medicinais envolve algumas estratégias tecnológicas que incluem o *screening* biológico, a descoberta e tentativa de isolamento da substância responsável pela atividade de interesse, além das triagens clínicas (BIBI et al., 2011). As plantas medicinais podem exibir diversos potenciais terapêuticos, entre eles, a atividade antimicrobiana contra uma série de micro-organismos considerados resistentes aos fármacos convencionalmente utilizados na terapia, fato que incentiva ainda mais a investigação desses agentes antimicrobianos de origem natural (DIAZ et al., 2010; WENDAKOON et al., 2012). Todos os anos, cerca de dois terços dos produtos químicos identificados são extraídos de plantas medicinais (AL-SNAFI, 2015). São vários os estudos encontrados na literatura que relatam a atividade antimicrobiana de extratos e óleos vegetais contra uma ampla variedade de bactérias, fungos e leveduras (AKTHAR; DEGAGA; AZAM, 2014). Além disso, os estudos que relatam também sua composição química e propriedades biológicas (*in vitro* e *in vivo*) que confirmem seus usos populares vêm se mostrando cada vez mais promissores (COSTA et al., 2010).

2.7.1. *Astronium urundeuva*

O gênero *Astronium*, pertencente à família Anacardiaceae, faz parte da lista de plantas estudadas no projeto Biota e apresenta como principais espécies o *A. fraxinifolium*, *A. graveolens* e o *A. urundeuva*. Estudos anteriores com o caule e as folhas mostraram que, dentre estas espécies, o extrato hidroetanólico das folhas do *A. urundeuva* mostrou-se mais promissor ao apresentar melhor atividade antifúngica contra espécies de *Candida* sp. (BONIFÁCIO et al., 2015). A espécie *Astronium urundeuva* (Allemão) Engl. (Figura 5), popularmente conhecida como aroeira-preta ou aroeira-do-sertão, se distribui principalmente na América do Sul, incluindo as regiões nordeste, sudeste e centro oeste, e está geralmente associada a ambientes secos do cerrado, savanas e caatingas. Apresenta uma pequena flor que é facilmente polinizada pelas abelhas e pelo vento (GAINO et al., 2010; MACHADO; OLVIERA, 2014). O porte da aroeira-preta pode variar de acordo com sua região de ocorrência, mas geralmente apresenta 30 metros de altura, inflorescência entre julho e setembro e, maturação dos frutos de setembro a outubro, os quais são compostos por uma semente única (NUNES et al., 2008).

O projeto Biota (FAPESP) intitulado “Fitoterápicos padronizados para o tratamento de doenças crônicas” envolve diversos pesquisadores das mais diversas áreas e tem como objetivo principal estudar de maneira mais profunda algumas plantas a fim de facilitar o desenvolvimento de novos fármacos fitoterápicos. Este projeto encontra-se em consonância com a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos do Ministério da Saúde, a qual visa proporcionar alternativas terapêuticas para a população a partir de plantas medicinais. Dessa maneira, alguns benefícios poderiam ser trazidos à população, como por exemplo, o acesso aos medicamentos de maneira mais fácil, além da inclusão social e regional. Entretanto, para que estes benefícios sejam realmente colocados em prática, é indispensável que alguns fatores sejam levados em consideração, como a preservação do conhecimento tradicional da população que faz uso das plantas medicinais, bem como o uso sustentável da biodiversidade (ANVISA, 2012). Além disso, para que qualquer produto fitoterápico seja utilizado de maneira segura e eficaz, se faz necessária a identificação exata de seus constituintes fitoquímicos bem como sua análise farmacológica e toxicológica (SILVA et al., 2011; DUTRA et al., 2016).

Figura 5. Planta *A. urundeuva* (Allemão) Engl.



Fonte: Lorenzi, 2008.

É uma das principais plantas utilizada na medicina tradicional nordestina para o tratamento de várias doenças (CUNHA et al., 2009). O extrato aquoso do caule é bastante utilizado sob a forma de semicúpio (“banho-de-assento”) após o parto. Além disso, também é indicada no tratamento de gastrites, úlceras gástricas, cervicites, vaginites, hemorroidas (LORENZI, 2008) e como anti-inflamatório e cicatrizante natural (PINHO et al., 2012; HERNÁNDEZ et al., 2013).

A planta *A. urundeuva* apresenta diversas propriedades terapêuticas, as quais são justificadas pela presença de seus principais constituintes fitoquímicos, como taninos hidrolisáveis e condensados, além dos óleos essenciais, os quais justificam o aroma típico encontrado nas folhas desta espécie (CUNHA et al., 2009; CARLINI et al., 2010). Foram identificados cerca de 16 constituintes voláteis, entre eles, o α -pineno, γ -terpineno, o δ -3-careno e o β -cariofileno, considerado o principal constituinte (SÁ, 2008; COSTA et al., 2014). Souza et al. (2007) comprovaram o efeito anti-inflamatório e antiulcerogênico de uma fração do caule desta espécie enriquecida em taninos.

Embora existam alguns estudos que comprovem tais propriedades, não há relatos na literatura sobre quais os principais componentes das folhas de *A. urundeuva* responsáveis pela atividade antifúngica frente às duas espécies de *Candida* sp. mais envolvidas nos quadros de infecções fúngicas, especialmente na CVV: *C. albicans* e *C. glabrata*, o que impulsiona ainda mais as pesquisas direcionadas à triagem fitoquímica na tentativa de identificar as substâncias que apresentam suas propriedades biológicas, em especial, a antifúngica.

2.8. Sistemas nanoestruturados

Muitas vezes, determinada substância que apresente alguma atividade biológica de interesse pode também apresentar determinadas características próprias que impeçam sua utilização, como por exemplo, ao apresentar propriedades indesejáveis e/ou comportamento não tão desejado em meio biológico. Além disso, também podem apresentar problemas durante o processo de formulação, ao serem incompatíveis com os demais componentes ou até mesmo pelo fato de não suportarem a presença de outro componente ativo nesta mesma formulação (BHARATE; BHARATE; BAJAJ, 2010).

A nanotecnologia vem surgindo como uma alternativa promissora e bastante desejada no tratamento de diversas doenças, pois é capaz de driblar a grande maioria dos obstáculos que surgem durante o processo de formulação. Além disso, os sistemas nanoestruturados são capazes de aprimorar o comportamento biológico de diversos ativos e podem até mesmo controlar de maneira eficiente sua liberação com vetorização diferenciada para determinados tecidos ou órgãos do organismo aumentando sua seletividade. Todas essas estratégias que permitem a redução da dose total necessária a fim de se garantir uma redução dos efeitos colaterais indesejados, além de controlar a liberação do ativo tem chamado atenção das indústrias e comunidade científica (BOURZAC, 2012; GRILL et al., 2009; VENUGOPAL et al., 2009).

Além de permitir a utilização de ativos que antigamente eram impedidos de serem utilizados, os sistemas nanoestruturados podem aprimorar ativos já utilizados que frequentemente apresentam algumas inconveniências. Por exemplo, além da incorporação de substâncias com caráter hidro ou lipofílico, os sistemas nanoestruturados são capazes de proteger ativos da degradação térmica ou fotodegradação, agir como sistemas reservatórios e diminuir o grau de toxicidade (BONIFÁCIO et al., 2014).

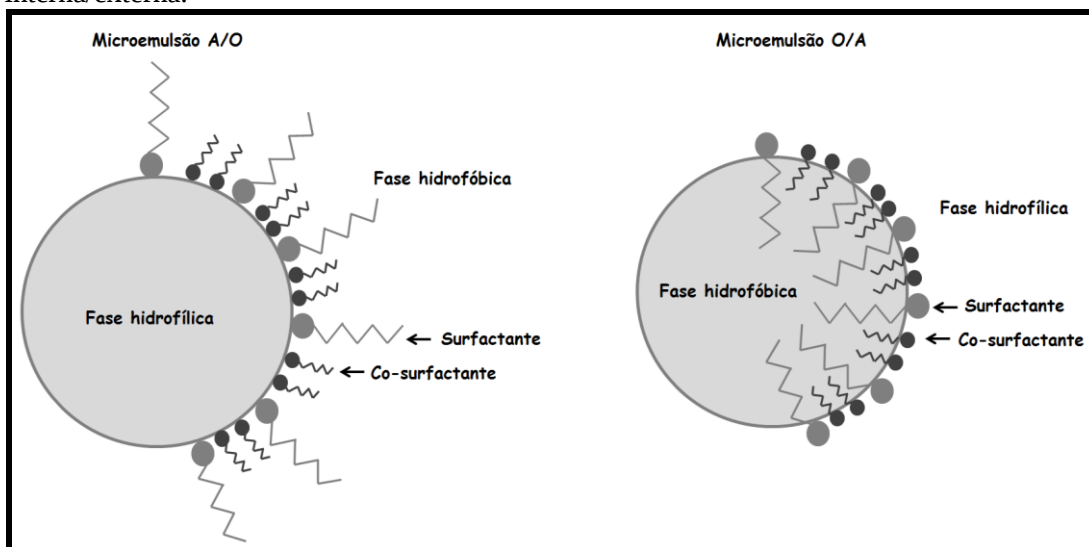
O uso da nanotecnologia como uma estratégia de aprimorar a atividade dos mais diversos constituinte vem sendo utilizado nas mais diversas áreas, incluindo até mesmo a fitoterapia (WANG et al., 2016). Alguns autores relataram na literatura a utilização de sistemas nanoestruturados com o intuito de potencializar a ação de alguns extratos de plantas, de forma a diminuir a dose requerida e, conseqüentemente, os efeitos indesejáveis (GHOSH et al., 2013; RAJENDRAN et al., 2013).

Alguns estudos encontrados na literatura relatam como principais componentes majoritários no extrato de *Astronium* sp, os taninos, óleos essenciais, flavonoides, entre

outros, frequentemente associados a propriedades antimicrobianas (DAS et al., 2010). O aumento da afinidade entre ativo *versus* alvo é extremamente interessante, pois permitirá uma liberação mais direcionada aumentando sua biodisponibilidade (PARK, 2014).

Entre os mais diversos sistemas nanoestruturados, as microemulsões (ME) se apresentam como o exemplo clássico. São normalmente definidas como emulsões transparentes, nas quais são encontradas gotículas na ordem de nanômetros (nm) cercadas por um componente externo de diferente grau de hidrofília/lipofilia (FANUN, 2012). Caso essas microgotículas sejam de óleo em água (O/A) ou de água em óleo (A/O), esse sistema pode ser considerado termodinamicamente estável devido à presença de um terceiro componente, o tensoativo, considerado extremamente essencial para a formação de uma microemulsão, pois é ele quem irá permitir que tais componentes permaneçam na mesma formulação. Em algumas situações, a utilização de um determinado tensoativo não resulta na presença de gotículas da ordem de nanômetros e, assim, se faz necessária a presença de um co-tensoativo que irá auxiliar a formação de gotículas do tamanho exigido para ser classificado como um sistema nanoestruturado e, assim, aprimorar o efeito terapêutico (MARTIN et al., 2015). Justamente por apresentarem tamanhos diferentes de gotículas, as MEs se diferem das emulsões, as quais são classificadas como sistemas microestruturados que apresentam gotículas maiores que a escala manométrica. Acredita-se que tal diferença de tamanho é capaz de alterar a capacidade biológica do ativo incorporado, influenciando na solubilidade e, conseqüentemente, na eficácia (McCLEMENTS, 2012).

Figura 6. Gotículas formadas em uma microemulsão água óleo (A/O) e óleo água (O/A) devido a presença de surfactante e co-surfactante, os quais estão posicionados de acordo sua afinidade com a fase interna/externa.



Fonte: Adaptado de Silva et al., 2014.

Atualmente existem no mercado, algumas formulações contendo antifúngicos já comercializados, que foram desenvolvidas com o objetivo de melhorar as vantagens ou reduzir os efeitos colaterais destes fármacos já disponíveis no mercado. Na tentativa de reduzir o principal efeito colateral da anfotericina B convencional (toxicidade), o Ambisome[®] surgiu no mercado e se apresenta na forma de um composto lipossomal unilamelar contendo esse ativo. Sua formulação é composta de fosfatidilcolina de soja hidrogenada, distearoilfosfatidilglicerol e colesterol. Entretanto, a utilização destas novas formulações ainda é considerada um desafio pelos centros médicos públicos em virtude do seu elevado custo de produção, custando cerca de 20 vezes mais caro que sua forma convencional (AVERSA et al., 2017).

6. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- ✓ As substâncias ácido gálico, galato de metila e galato de etila foram identificadas no extrato das folhas de *A. urundeuva*;
- ✓ A substância PGG, inicialmente identificada no extrato em outro estudo, não foi mais encontrada quando o mesmo foi analisado novamente após um determinado período de tempo, indicando que esta provavelmente foi degradada;
- ✓ Não é possível afirmar se a presença das substâncias galato de metila e galato de etila no extrato pode ser consequência do processo de degradação (metanólise e etanólise, respectivamente) a partir do PGG, ou se podem ser consideradas um metabólito secundário da planta;
- ✓ Pode-se verificar que as substâncias galato de metila e galato de etila são as responsáveis por grande parte da atividade antifúngica do extrato contra a espécie *C. glabrata*, mas que ainda assim, existe a ação sinérgica de outros componentes do extrato que permitem uma maior atividade antifúngica, uma vez que este apresentou um menor valor de CIM;
- ✓ A atividade antifúngica contra a espécie *C. albicans* se dá provavelmente devido a um sinergismo entre as substâncias identificadas com outras substâncias minoritárias não identificadas no extrato, ou até mesmo devido a estas substâncias não identificadas;
- ✓ A quantificação das substâncias identificadas no extrato mostrou que o extrato encontra-se em processo de degradação uma vez que foi observado redução do teor das substâncias identificadas em relação ao estudo anterior realizado por Perez (2012). Ainda assim, a substância galato de etila foi identificada como a de maior teor no extrato;
- ✓ O ensaio de combinação através do método *Checkerboard* entre as substâncias identificadas confirmou a importância dos componentes minoritários para a atividade contra as espécies *Candida* sp., principalmente para a espécie *C. albicans* já que nem a combinação das substâncias identificadas entre si foi capaz de ser efetiva contra esta espécie;
- ✓ Apesar de o extrato incorporado na ME ter apresentado um mesmo valor de CIM na determinação da atividade antifúngica, este foi capaz de apresentar um efeito fungicida na mesma concentração apresentada, enquanto que o extrato livre mostrou um efeito fungistático nesta mesma concentração;
- ✓ Os ensaios *in vitro* de citotoxicidade mostraram que o extrato não se apresenta citotóxico para as linhagens VERO e MRC5, apresentando-se ainda mais seletivo para as células de interesse

principalmente após a incorporação (linhagem VERO). O mesmo não foi observado para a linhagem HaCaT, na qual o extrato além de apresentar-se citotóxico, mostrou-se menos seletivo para as células de interesse após a incorporação;

- ✓ O ensaio de citotoxicidade utilizando o modelo alternativo de *Artemia salina* L. mostrou resultados bastante promissores para o extrato livre e incorporado ao garantir 100% da viabilidade dos náuplios mesmo quando expostos a maior concentração. Tal viabilidade foi um pouco reduzida quando os mesmos foram tratados com o padrão de ácido gálico. Para o padrão de galato de metila, o grau de toxicidade foi aumentado e, ainda mais para o galato de etila, quando utilizados na maior concentração;
- ✓ No ensaio *in vivo* de CVV, os animais tratados com o extrato incorporado nas MEs A e B foram curados mais rapidamente em relação os tratados apenas com o extrato livre e com o controle positivo (anfotericina B), sendo que adição do Poloxamer® 407 na ME B na concentração utilizada (0,5 %) não apresentou diferença significativa na redução da carga fúngica dos animais em relação aos tratados com a ME sem poloxamer (ME A). Além disso, os animais tratados com o extrato incorporado nas MEs A e B foram os únicos que permaneceram curados até o final do período de recidiva;
- ✓ O extrato livre apresentou forte atividade *in vitro* contra os isolados clínicos de *C. albicans* e *C. glabrata*, mesmo contra aquelas consideradas resistentes aos fármacos mais comumente utilizados no tratamento, como fluconazol, anfotericina B e caspofungina;
- ✓ O ensaio de combinação entre o extrato e os fármacos convencionalmente utilizados mostrou ação sinérgica quando o extrato foi combinado com anfotericina e fluconazol para *C. albicans* e com fluconazol para *C. glabrata*. Além disso, o efeito sinérgico também foi observado quando o padrão de galato de etila foi combinado com anfotericina para *C. glabrata*;
- ✓ O extrato livre foi capaz de inibir a formação de biofilme de *C. albicans* na mesma concentração utilizada para as células planctônicas, porém necessitou de uma maior concentração para inibir o biofilme de *C. glabrata*. Em contrapartida, o extrato não foi efetivo em biofilmes pré-formados das duas espécies de *Candida* sp.;
- ✓ O ensaio de desenvolvimento de resistência mostrou que em contraste ao fluconazol, no qual foi observado desenvolvimento de resistência durante a exposição, as cepas não se tornaram resistentes após serem expostas ao extrato livre ao manterem seus valores de CIM do início ao fim do experimento;

- ✓ Além de apresentar atividade antifúngica contra as espécies de *Candida* sp, o extrato livre também mostrou-se promissor contra as cepas de *C. neoformans* (WSA e R4247) e *C. gattii* R265 ao apresentar valores de CIM significativos;
- ✓ Ao contrário do ocorrido para as leveduras, o extrato não demonstrou atividade para fungos filamentosos, exceto para *Rhizopus arrhizus*, confirmando sua maior seletividade para as leveduras, principalmente para as espécies de *Candida* sp.

De uma maneira geral, pode-se concluir que o extrato das folhas de *A urundeuva* apresenta-se extremamente promissor como uma fonte alternativa de tratamento para a candidíase uma vez que necessita de concentrações extremamente baixas para ser efetivo contra as cepas de *Candida* sp, incluindo até mesmo isolados clínicos resistentes aos fármacos convencionais, além de mostrar-se seletivo para as células de interesse, o que poderia apresentar redução significativa dos efeitos colaterais.

REFERÊNCIAS

ACHKAR, J. M.; FRIES, B. C. *Candida* infections of the genitourinary tract. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 2, p. 253-273, 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. SUS financia seis novos fitoterápicos. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id_area=124&CO_NOTICIA=10896>. Data de Publicação: 2 de dezembro de 2009. Acesso: 03 fev. 2012.

AKTHAR, M. S.; DEGAGA, B.; AZAM, T. Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: a review. **Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research**, v. 2, n. 1, p. 1-7, 2014.

ALEXANDER, B. D.; JOHNSON, M. D.; PFEIFFER, C. D.; JIMÉNEZ-ORTIGOSA, C.; CATANIA, J.; BOOKER, R.; CASTANHEIRA, M.; MESSER, S. A.; PERLIN, D. S.; MICHAEL, A. P. Increasing Echinocandin Resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. **Clinical Infectious Diseases**, v. 56, n. 12, p. 1724-1732, 2013.

AL-SNAFI, A. E. Therapeutic properties of medicinal plants: a review of their antibacterial activity. **International Journal of Pharmacy & Therapeutics**, v. 6, n. 3, p. 137-158, 2015.

ALVES, P. M.; QUEIROZ, L. M. G.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. S. V. Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica in vitro de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 222-224, 2009.

ALVES, C. T.; FERREIRA, I. C. F. R.; BARROS, L.; SILVA, S.; AZEREDO, J.; HENRIQUES, M. Antifungal activity of phenolic compounds identified in flowers from North Eastern Portugal against *Candida* species. **Future Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 139-146, 2014.

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.

ARMSTRONG-JAMES, D.; MEINTJES, G.; BROWN, G. D. A neglected epidemic: fungal infections in HIV/AIDS. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 3, p. 120-127, 2014.

AVERSA, F.; BUSCA, A.; CANDONI, A.; CESARO, S.; GIRMENIA, C.; LUPPI, M.; NOSARI, A. M.; PAGANO, L.; ROMANI, L.; ROSSI, G.; VENDITTI, A.; NOVELLI, A. Liposomal amphotericin B (AmBisome®) at beginning of its third decade of clinical use. **Journal of Chemotherapy**, v. 29, n. 3, p. 131-143, 2017.

BADIEE, P.; HASHEMIZADEH, Z. Opportunistic invasive fungal infections: diagnosis & clinical management. **Indian Journal of Medical Research**, v. 139, n. 2, p. 195-204, 2014.

- BARAI, L.; FATEMA, K.; HAQ, J. A.; FARUQ, M. O.; AHSAN, A. A.; MORSHED, M. A. H. G.; HOSSAIN, M. B. Bacterial profile and their antimicrobial resistance pattern in an intensive care unit of a tertiary care hospital in Dhaka. **Ibrahim Medical College Journal**, v. 4, n. 2, p. 66-69, 2010.
- BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. B. G. Candidíase. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 22, n. 1, p. 22-38, 2010.
- BARBOSA, C.; FERNANDES, G.; QUINTAS, C.; ESTER TEIXEIRA, M.; PEDRO NEVES, J. Derivados azólicos no tratamento da candidíase vulvovaginal não complicada. **Acta Obstetrica e Ginecologica Portuguesa**, v. 6, n. 3, p. 118-123, 2012.
- BHARATE, S. S.; BHARATE, S. B.; BAJAJ, A. N. Interactions and incompatibilities of pharmaceutical excipients with active pharmaceutical ingredients: a comprehensive review. **Journal of Excipients and Food Chemicals**, v. 1, n. 3, p. 3-26, 2010.
- BIANCO, K. G.; LANDUCI, L. F.; SCHEWEITZER, C. M.; GAETTI-JARDIM, E. C. Influence of subinhibitory concentrations of extracts from *Psidium cattleianum* (Sabine) and *Myracrodruon urundeuva* (Allemao) on mutans streptococci adhesion to glass and enamel surfaces. **Archives of Health Investigation**, v. 6, n. 3, p. 136-140, 2017.
- BIBI, Y.; NISA, S.; CHAUDHARY, F. M.; ZIA, M. Antibacterial activity of some selected medicinal plants of Pakistan. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, p. 52-58, 2011.
- BOATTO, H. F.; GIRÃO, M. J. B. C.; FRANCISCO, E. C.; MACHADO, A. P.; MORAES, M. S.; FISCHMAN, O. Susceptibility to fluconazole and ketoconazole of *Candida* spp. isolated from primary and episodic vulvovaginites by E-Test (São Paulo, SP, Brazil). **Open Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 6, n. 12, p. 689-697, 2016.
- BOECKEL, D. G. **Ensaio de citotoxicidade do Ácido hialurônico como veículo no composto celular autógeno para enxertia óssea**. 2011. 72f. Dissertação (Mestrado Prótese Dentária) - Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Porto Alegre, 2011.
- BONIFÁCIO, B. V.; SILVA, P. B.; RAMOS, M. A. S.; NEGRI, K. M. S.; BAUAB, T. M.; CHORILLI, M. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 1-15, 2014.
- BONIFÁCIO, B. V.; RAMOS, M. A. S.; SILVA, P. B.; NEGRI, K. M. S.; LOPES, E. O.; SOUZA, L. P.; VILEGAS, W.; PAVAN, F. R.; CHORILLI, M.; BAUAB, T. M. Nanostructured lipid system as a strategy to improve the anti-*Candida albicans* activity of *Astronium* sp. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, 5081-5092, 2015.
- BOURZAC, K. Nanotechnology: carrying drugs. **Nature**, v. 491, n. 7425, p. S58-60, 2012.
- BOUZA, E.; GUINEA, J.; GUEMBE, M. The role of antifungals against *Candida* biofilm in catheter-related candidemia. **Antibiotics**, v. 4, n. 1, p. 1-17, 2015.

- BRESOLIN, T.M.B.; FILHO, V.C. **Fármacos e Medicamentos**: uma abordagem multidisciplinar. São Paulo: Santos, 2010. 436 p.
- BROWN, G. D.; DENNING, D. W.; GOW, N. A. R.; LEVITZ, S. M.; NETEA, M. G.; WHITE, T. C. Hidden killers: human fungal infections. **Medical Mycology**, v. 4, n. 165, p. 165rv13, 2012.
- CARLINI, E. A.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; RODRIGUES, E.; TABACH, R. Antiulcer effect of the pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-da-praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão, Anacardiaceae (aroeira-do-sertão). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 140-146, 2010.
- CARTAXO, S. L.; SOUZA, M. M. A.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brasil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, p. 326-342, 2010.
- CARVALHO, A. G. **Isolamento e identificação de compostos fenólicos em folhas de *Eugenia uniflora* L.** 2013.44 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química, Goiânia, 2013.
- CASTAÑEDA, D. M.; POMBO, L. M.; URUEÑA, C. P.; HERNANDEZ, J. F.; FIORENTINO, S. A gallotannin-rich fraction from *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze displays cytotoxic activity and raises sensitivity to doxorubicin in a leukemia cell line. **BMC Complementary & Alternative Medicines**, v. 12, n. 38, doi: 10.1186/1472-6882-12-38, 2012.
- CHAFFIN, W. L.; LÓPEZ-RIBOT, J. L.; CASANOVA, M.; GOZALBO, D.; MARTÍNEZ, J. P. Cell wall and secreted proteins of *C. albicans*: identification, function, and expression. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p.130-180, 1998.
- CLSI. **Manual Clinical and Laboratory Standards Institute**. Reference methods for broth dilution antifungal susceptibility tests for yeasts; approved standards, CLSI document M27-A3, Wayne, PA., 2008.
- CLSI. **Manual Clinical and Laboratory Standards Institute**. Reference methods for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standards, CLSI document M38-A2, Wayne, PA., 2008.
- COHEN, B. E. The role of signaling via aqueous pore formation in resistance responses to amphotericin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 9, p. 5122-5129, 2016.
- COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUÉR, S. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; DA MATTA, D. A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2816-23, 2006.
- COSTA, E. M. M. B.; BARBOSA, A. S.; ARRUDA, T. A.; OLIVEIRA, P. T.; DAMETTO, F. R.; CARVALHO, R. A.; MELO, M. D. Estudo *in vitro* da ação antimicrobiana de extratos

de plantas contra *Enterococcus faecalis*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 3, p. 175-180, 2010.

COSTA, O. B.; DEL MENEZZI, H. S.; BENEDITO, L. E. C.; RESCK, I. S.; VIEIRA, R. F.; BIZZO, H. R. Essential oil constituents and yields from leaves of *Blepharocalyx salicifolius* (Kunt) O. Berg and *Myracrodruon urundeuva* (Allemão) collected during daytime. **International Journal of Forestry Research**, v. 2014, p. 1-6, 2014.

COWEN, L. E.; NANTEL, A.; WHITEWAY, M. S.; THOMAS, D. Y.; TESSIER, D. C.; KOHN, L. M.; ANDERSON, J. B. Population genomics of drug resistance in *Candida albicans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 14, 2002.

CUNHA, F. P.; COSTA, L. J. L.; FERNANDES, A. J. D.; SOUZA, T. P.; SOARES, L. A. L. Development and optimization of extractives from *Astronium urundeuva* (allemão) Engl. by factorial design. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 3, p. 647-652, 2009.

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 174-181, 2012.

DAS, K.; TIWARI, R.K.S.; SHRIVASTAVA, D.K. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 2, p. 104-111, 2010.

DIAZ, M. A. N.; ROSSI, C. C.; MENDONÇA, V. R.; SILVA, D. M.; RIBON, A. O. B.; AGUILAR, A. P.; MUÑOZ, G. D. Screening of medicinal plants for antibacterial activities on *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 724-728, 2010.

DOMINGUEZ, E. G.; ANDES, D. R. ***Candida albicans*: cellular and molecular biology**. Springer International Publishing AG, 2017. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-50409-4>, p. 77-92.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELINA, C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 305-311, 2005.

DUARTE, M. L. B. **Potencial anti-*Helicobacter pylori* de extratos hidroetanólicos de caule e folhas de *Astronium urundeuva***. 2014. 39 F. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Araraquara, 2014.

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacology Research**, v. 112, p. 4-29, 2016.

FALCI, D. R.; ROSA, F. B.; PASQUALOTTO, A. C. Comparison of nephrotoxicity associated to different lipidformulations of amphotericin B: a real-life study. **Mycosis**, v. 58, n. 2, p. 104-112, 2017.

- FANUN, M. Microemulsions as delivery systems. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, n. 5, p. 306-313, 2012.
- FERREIRA, G. L. S.; PÉREZ, A. L. A. L.; ROCHA, I. M.; PINHEIRO, M. A.; CASTRO, R. D.; CARLO, H. L.; LIMA, E. O.; CASTELLANO, L. R. Does scientific evidence for the use of natural products in the treatment of oral candidiasis exist? a systematic review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1-8, 2015.
- FILLER S.G. *Candida*-host cell receptor-ligand interactions. **Current Opinion Microbiology**, v. 9, p. 333-339, 2006.
- FLOWERS, S. A.; CÓLON, B.; WHALEY, S. G.; SCHULER, M. A.; ROGERS, P. D. Contribution of clinically derived mutations in ERG11 to azole resistance in *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 1, p. 450-460, 2015.
- GAETTO-JARDIM JÚNIOR, E.; LANDUCCI, L. F.; ARAFAT, O. K. K.; RANIERI, R. V.; RAMOS, M. M. B.; CIESIELSKI, F. I. N.; SCHWEITZER, C. M.; OKAMOTO, A. C. Antimicrobial activity of six plant extracts from the Brazilian Savanna on periodontal pathogens. **International Journal of Odontostomatology**, v. 5, n. 3, p. 249-256, 2011.
- GAINO, A. P. S. C.; SILVA, A. M.; MORAES, M. A.; ALVES, P. F.; MORAES, M. L. T.; FREITAS, M. L. M.; SEBBENN, A. M. Understanding the effects of isolation on seed and pollen flow, spatial genetic structure and effective population size of the dioecious tropical tree species *Myracrodruon urundeuva*. **Conservation Genetics Resources**, v. 11, n. 5, p. 1631-1643, 2010.
- GARCIA-CUESTA, C.; SARRION-PÉREZ, M. G.; BAGÁN, J. V. Current treatment of oral candidiasis: a literature review. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, v. 6, n. 5, p. 576-582, 2014.
- GALVALDA, J.; MEIJE, Y.; FORTÚN, J.; ROILIDES, E.; SALIBA, F.; LORTHOLARY, O.; MUÑOZ, P.; GROSSI, P.; CUENCA-ESTRELLA, M. Invasive fungal infections in solid organ transplant recipients. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 7, p. 27-48, 2014.
- GHOSH, V.; SARANYA, S.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Antibacterial microemulsion prevents sepsis and triggers healing of wound in wistar rats. **Colloids Surf. B: Biointerfaces**, v. 105, p. 152-157, 2013.
- GIRARDOT, M.; IMBERT, C. Natural sources as innovative solutions against fungal biofilms. **Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health**, v. 931, p. 105-125, 2016.
- GOEL, G.; MAKKAR, H. P. S. Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, n. 4, p. 729-739, 2012.
- GOYAL, U., ARORA, R., AGGARWAL, G. Formulation design and evaluation of a self-microemulsifying drug delivery system of lovastatin. **Acta Pharm.**, v. 62, n. 3, p. 357-370, 2012.

- GUDIÑA, E. J.; ROCHA, V.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *Paracasei* A20. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 419-424, 2010.
- GUINEA, J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 6, p. 5-10, 2014.
- 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.
- HAWSER, S.; ISLAM, K. Comparisons of the effects of fungicidal and fungistatic antifungal agents on the morphogenetic transformation of *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 43, n. 3, p. 411-413, 1999
- HERÁNDEZ, V.; MORA, F.; ARAQUE, M.; MONTIJO, S.; ROJAS, L.; MELÉNDEZ, P.; TOMMASI, N. Chemical composition and antibacterial activity of *Astronium graveolens* Jacq essential oil. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 41, n. 2, p. 89-94, 2013.
- HINDLER, J. Antimicrobial susceptibility testing, **Clinical microbiology procedures handbook**. American Society for Microbiology, H.D. Isenberg (ed.): Washington, D.C., 1995, p. 5.18.11–15.18.20.
- HOEHAMER, C. F.; CUMMINGS, E. D.; HILLIARD, G. M.; MORSCHHAUSER, J.; ROGERS, P. D. Upc2p-associated differential protein expression in *Candida albicans*. **Proteomics**, v. 9, n. 20, p. 4726-4730, 2009.
- HÖRNER, M.; GIGLIO, V. F.; SANTOS, A. J. R. W. A.; WESTPHALEN, A. B.; INGLESIAS, B. A.; MARTINS, P. R.; AMARAL, C. H.; MICHELOT, T. M.; REETZ, L. G. B.; BERTONCHELI, C. M.; PARAGINSKI, G. L.; HORNER, R. Triazenos e atividade antibacteriana. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 441-449, 2008.
- KAUR, S.; MONDAL, P. Study of Total Phenolic and Flavonoid Content, Antioxidant Activity and Antimicrobial Properties of Medicinal Plants. **Journal of Microbiology & Experimentation**, v. 1, n. 1, 2014.
- KHANBABAEE, K.; LÖTZERICH, K. Efficient total synthesis of the natural products 2,3,4,6-tetra-O-galloyl-D-glucopyranose, 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucopyranose and the unnatural 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-α-D-glucopyranose. **Tetrahedron**, v. 53, p. 10725-10732, 1997.
- KUCHARÍKOVÁ, S.; TOURNU, H.; HOLTAPPELS, M.; VAN DIJCK, P.; LAGROU, K. *In vivo* efficacy of anidulafungin against mature *Candida albicans* biofilms in a novel rat model of catheter-associated candidiasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 10, p. 4474-4475, 2010.

- LAFAYETTE, S. L.; COLLINS, C.; ZAAS, A. K.; SCHELL, W. A.; BETANCOURT-QUIROZ, M.; GUNATILAKA, A. A. L.; PERFECT, J. R.; COWEN, L. E. PKC Signaling regulates drug resistance of the fungal pathogen *Candida albicans* via circuitry comprised of Mkc1, calcineurin, and Hsp90. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 8, e1001069, 2010.
- LIM, C. S.; ROSLI, R.; SEOW, H. F.; CHONG, P. P. *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 31, n. 1, p. 21-31, 2012.
- LI, Z.J.; LIU, M.; DAWUTI, G.; DOU, Q.; MA, Y.; LIU, H.G.; AIBAI, S. Antifungal activity of gallic acid *in vitro* and *in vivo*. **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 7, p. 1039-1045, 2017.
- LIU, S.; HOU, Y.; CHEN, X.; GAO, Y.; LI, H.; SUN, S. Combination of fluconazole with non-antifungal agents: a promising approach to cope with resistant *Candida albicans* infections and insight into new antifungal agent discovery. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 43, n. 5, p. 395-402, 2014.
- LOHBERGER, A.; COSTE, A. T.; SANGLARD, D. Distinct roles of *Candida albicans* drug resistance transcription factors TAC1, MRR1, and UPC2 in virulence. **Eucaryotic cell**, v. 13, n. 1, p. 127-142, 2014.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 5. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2008. v. 1, 384 p.
- LUYT, C. E.; BRÉCHOT, N.; TROUILLET, J. L.; CHASTRE, J. Antibiotic stewardship in the intensive care unit. **Critical Care**, v. 18, p. 480-492, 2014.
- MACHADO, A. C.; OLIVEIRA, R. C. Medicamentos Fitoterápicos na odontologia: evidências e perspectivas sobre o uso da aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Allemão). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 283-289, 2014.
- MARCHAIM, D.; LEMANEK, L.; BHEEMREDDY, S.; KAYE, K. S.; SOBEL, J. D. Fluconazole-resistant *Candida albicans* vulvovaginitis. **Obstetrics & Gynecology**, v. 120, n. 6, p. 1407-1414, 2012.
- MAROYI, A. Traditional use of medicinal plants in south-central Zimbabwe: review and perspectives. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 9, doi: 10.1186/1746-4269-9-31, 2013.
- MARRAZZO, J. M. Vulvovaginal candidiasis: over the counter doesn't seem to lead to resistance. **British Medical Journal**, v. 326, p. 993-994, 2003.
- MARTIN, C.; LOW, W. L.; GUPTA, A.; AMIN, M. C. I. M.; RADECKA, I.; BRITLAND, S. T.; RAJ, P.; KENWARD, K. Strategies for Antimicrobial Drug Delivery to Biofilm. **Current Pharmaceutical Design**, v. 21, p. 43-66, 2015.
- MARTINEZ, L. R.; FRIES, B. C. Fungal Biofilms: Relevance in the Setting of Human Disease. **Current Fungal Infectious Reports**, v. 4, n. 4, p. 266-275, 2010.

MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2., p. 119-128, 2013.

MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions *versus* microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, v. 8, p. 1719-1729, 2012.

MERENSTEIN, D.; HU, H.; WANG, C.; HAMILTON, P.; BLACKMON, M.; CHEN, H.; CALDERONE, R.; LI, D. Colonization by *Candida* species of the oral and vaginal mucosa in HIV-infected and noninfected women. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 29, n. 1, p. 30-34, 2013.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; McLAUGHLIN. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 45, n. 5, p. 31-34, 1982.

MOGHIMIPOUR, E.; SÂLIMI, A.; EFTEKHARI, S. Design and Characterization of Microemulsion Systems for Naproxen. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 3, n. 1, p. 63-71, 2013.

MORETTI, M. L.; TRABASSO, P.; LYRA, L.; FAGNANI, R.; RESENDE, M. R.; CARDOSO, L. G. O.; SCHREIBER, A. Z. Is the incidence of candidemia caused by *Candida glabrata* increasing in Brazil? Five-year surveillance of *Candida* bloodstream infection in a university reference hospital in southeast Brazil. **Medical Mycology**, v. 51, n. 3, p. 225-230, 2013.

MORIO, F.; PAGNIEZ, F.; BESSE, M.; GAY-ANDRIEU, F.; MIEGEVILLE, M.; PAPE, P. L. Deciphering azole resistance mechanisms with a focus on transcription factor-encoding genes TAC1, MRR1 and UPC2 in a set of fluconazole-resistant clinical isolates of *Candida albicans*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 42, n. 5, p. 410-415, 2013.

MUKAREMERA, L.; LEE, K. K.; MORA-MONTES, H. M.; GOW, N. A. R. *Candida albicans* Yeast, Pseudohyphal, and Hyphal Morphogenesis Differentially Affects Immune Recognition. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. 629, doi:10.3389/fimmu.2017.00629, 2017.

NASRI, H.; SHIRZAD, H. Toxicity and safety of medicinal plants. **Journal of HerbMed Pharmacology**, v. 2, n. 2, p. 21-22, 2013.

NETEA, M. G.; JOOSTEN, L. A. B.; VAN DER MEER, J. W. M.; KULLBERG, B. J.; VAN DE VEERDONK, F. L. Immune defence against *Candida* fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 10, p. 630-642, 2015.

NOGUEIRA, C. M.; PARMANHAN, B. R.; FARIAS, P. P. CORRÊA, A. G. A importância crescente dos carboidratos em química medicinal. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 2, p. 149-159, 2009.

NUNES, Y. R. F.; FAGUNDES, M.; ALMEIDA, H. S.; VELOSO, M. D. M. Aspectos ecológicos da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Allemão – Anacardiaceae): fenologia e germinação de sementes. **Revista Árvore**, v. 32, n. 2, p. 233-243, 2008.

- OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; COELHO, T. S.; SILVA, P. E. A.; LOURENÇO, M. C. S.; LEITÃO, S. G. Ethnopharmacological versus random plant selection methods for the evaluation of the antimycobacterial activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 5, p. 793-806, 2011.
- OOSHIRO, A.; HIRADATE, S.; KAWANO, S.; TAKUSHI, T.; FUJII, Y.; NATSUME, M.; ABE, H. Identification and activity of ethyl gallate as an antimicrobial compound produced by *Geranium carolinianum*. **Weed Biology and Management**, v. 9, n. 2, p. 169-172, 2009.
- ORME, I. et al. Search for new drugs for treatment of tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 7, p. 1943-1946, 2001.
- PAPPAS, P. G.; KAUFFMAN, C. A.; ANDES, D. R.; CLANCY, C. J.; MARR, K. A.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REBOLI, A. C.; SCHUSTER, M. G.; VAZQUEZ, J. A.; WALSH, T. J.; ZAOUTIS, T. E.; SOBEL, J. D. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the infectious diseases society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, n. 4, p. 1-50, 2016.
- PARK, K. Controlled drug delivery systems: Past forward and future back. **Journal of Controlled Release**, v. 190, n. 28, p. 3-8, 2014.
- PARRA, A. L.; YHEBRA, R. S.; SARDIÑAS, G.; BUELA, L. I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD₅₀ value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, p. 395-400, 2001.
- PAVAN, F. R.; MAIA, P. I. S.; 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.
- PEIXOTO, J. V.; ROCHA, M. G.; NASCIMENTO, R. T. L.; MOREIRA, V. V.; KASHIWABARA, T. G. B. Candidíase - uma revisão de literatura. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 8, n. 2, p. 75-82, 2014.
- PEREA, S.; LOPEZ-RIBOT, J. L.; KIRKPATRICK, W. R.; MCATEE, R. K.; SANTILLÁN, R. A.; MARTÍNEZ, M.; CALABRESE, D.; SANGULARD, D.; PATTERSON, T. F. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus infected patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 10, p. 2676-2684, 2001.
- PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.
- PHAM, C. D.; IQBAL, N.; BOLDEN, C. B.; KUYKENDALL, R. J.; HARRISON, L. H.; FARLEY, M. M.; SCHAFFNER, W.; BELDAVS, Z. G.; CHILLER, T. M.; PARK, B. J.; CLEVELAND, A. A.; LOCKHART, S. R. Role of FKS mutations in *Candida glabrata*: MIC values, echinocandin resistance, and multidrug resistance. **Antimicrobials Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4690-4696, 2014.

PIERCE, C. G.; UPPULURI, P.; TRISTAN, A. R.; WORMLEY, F. L.; MOWAT, E.; RAMAGE, G.; LOPEZ-RIBOT, J. L. A simples and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **Nature Protocols**, v. 3, n. 9, p. 1494-1500, 2008.

PIERCE, C. G.; CHATURVEDI, A. K.; LAZZELL, A. L.; POWELL, A. T.; SAVILLE, S. P.; MCHARDY, S. F.; LOPEZ-RIBOT, J. L. A novel small molecule inhibitor of *Candida albicans* biofilm formation, filamentation and virulence with low potential for the development of resistance. **NPJ Biofilms and Microbiomes**, v. 1, pii: 15012, 2015.

PINHO, L.; SOUZA, P. N. S.; SOBRINHO, E. M.; ALMEIDA, A. C.; MARTINS, E. R. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoolicos das folhas de alecrim- pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. **Ciência Rural**, v. 42, n. 2, p. 326-331, 2012.

RAJENDRAN, R.; RADHAI, R.; KOTRESH, T. M.; CSISZAR, E. Development of antimicrobial cotton fabrics using herb loaded nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 2, p. 613-617, 2013.

RAMOS, M. A. S.; CALIXTO, G.; TOLEDO, L. G.; BONIFÁCIO, B. V.; SANTOS, L. C.; ALMEIDA, M. T. G.; CHORILLI, M.; BAUAB, T. M. liquid crystal precursor mucoadhesive system as a strategy to improve the prophylactic action of *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland against infection by *Candida krusei*. **International Journal of Nanomedicine**, v. 2015, p. 7455-7466, 2015.

RAMOS, M. A. S.; SILVA, P. B.; SPÓSITO, L.; TOLEDO, L. G.; BONIFÁCIO, B. V.; RODERO, C. F.; SANTOS, K. C.; CHORILLI, M.; BAUAB, T. M. Nanotechnology-based drug delivery systems for control of microbial biofilms: a review. **International Journal of Nanomedicine**, 2018.

RATTI, B. A.; GODOY, J. S. R.; MENDONÇA, P. S. B.; BIDÓIA, D. L.; NAKAMURA, T. U.; NAKAMURA, C. T.; CONSOLARO, M. E. L.; SVIDZINSKI, T. I. E.; SILVA, S. O. Microbicidal activity of neutrophils is inhibited by isolates from recurrent vaginal candidiasis (RVVC) caused by *Candida albicans* through fungal thioredoxin reductase. **Cellular Immunology**, v. 293, n. 1, p. 22-29, 2015.

REICHHARDT, C.; STEVENS, D. A.; CEGELSKI, L. Fungal biofilm composition and opportunities in drug discovery. **Future Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 12, p. 1455-1468, 2016.

REIS, B.; MARTINS, M.; BARRETO, B.; MILHAZES, N.; GARRIDO, E. M.; SILVA, P.; GARRIDO, J.; BORGES, F. Structure–property–activity relationship of phenolic acids and derivatives protocatechuic acid alkyl esters. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 11, p. 6986-6993, 2010.

SÁ, R. A.; NAPOLEÃO, T. H.; SANTOS, N. D. L.; GOMES, F. S.; ALBUQUERQUE, A. C.; XAVIER, H. S.; COELHO, L. C. B. B.; BIEBER, L. W.; PAIVA, P. M. G. Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva*

heartwood lectin. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 62, n. 4, p. 460–464, 2008.

SÁ, R. A.; ARGOLO, A. C. C.; NAPOLEÃO, T. H.; GOMES, F. S.; SANTOS, N. D. L.; MELO, C. M. L.; AURISTELA, C. A.; XAVIER, H. S.; COELHO, L. C. B. B.; BIEBER, L. W.; PAIVA, P. M. G. Antioxidant, *Fusarium* growth inhibition and *Nasutitermes corniger* repellent activities of secondary metabolites from *Myracrodruon urundeuva* heartwood. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 4, p. 470-477, 2009.

SACHIN, C. D.; RUCHI, K.; SANTOSH, S. In vitro evaluation of proteinase, phospholipase and haemolysin activities of *Candida* species isolated from clinical specimens. **International Journal of Medicine and Biomedical Research**, v. 1, n. 2, p. 153-157, 2012.

SARDI, J. C. O.; SCORZONI, L.; BERNARDI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES GIANNINI, M. J. S. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 10-24, 2013.

SAVOIA, D. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. **Future Microbiology**, v. 7, n. 8, p. 979-990, 2012.

SCIENCE PHOTO LIBRARY. *Candida albicans* yeast stage, SEM. Disponível em: <<https://www.sciencephoto.com/media/874098/view>>. Acesso em: 16 nov. 2017.

SCIENCE PHOTO LIBRARY. *Candida albicans*, yeast and new hyphae stages, SEM. Disponível em: <<https://www.sciencephoto.com/media/874091/view>>. Acesso em: 16 nov. 2017.

SCIENCE PHOTO LIBRARY. *Candida albicans* yeast and hyphae stages, SEM. Disponível em: <<https://www.sciencephoto.com/media/874090/view>>. Acesso em: 16 nov. 2017.

SCIENCE PHOTO LIBRARY. Yeast and extracellular matrix, SEM. Disponível em: <<https://www.sciencephoto.com/media/694272/view>>. Acesso em: 16 nov. 2017d.

SHAH, A. A.; AAMERA, M.; MAYANK, M.; KULKARNI, D. Pathogenesis of oral candidiasis. **Indian Journal of Dental Advancements**, v. 6, n. 2, p. 1529, 2014.

SHERRY, L.; KEAN, R.; MCKLOUD, E.; O'DONNELL, L. E.; METCALFE, R.; JONES, B. L.; RAMAGE, G. Biofilms formed by isolates from recurrent vulvovaginal candidiasis patients are heterogeneous and insensitive to fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 10.1128/AAC.01065-17, 2017.

SILVA, V. C.; NAPOLITANO, A.; ELETTO, D.; RODRIGUES, C. M.; PIZZA, C.; VILEGAS, W. Characterization of gallotannins from *Astronium* species by flow injection analysis- electrospray ionization-ion trap-tandem mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of- flight mass spectrometry. **European Journal of Mass Spectrometry**, v. 17, n. 4, p. 365-375, 2011.

- SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W.; AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 2, p. 288-305, 2012.
- SILVA, P. B.; RAMOS, M. A. S.; BONIFÁCIO, B. V.; NEGRI, K. M. S.; SATO, M. R.; BAUAB, T. M.; CHORILLI, M. Nanotechnological strategies for vaginal administration of drugs - a review. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 10, n. 9, p. 2218-2243, 2014.
- SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. 7 ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 486 p.
- SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/ Ed. UFSC, 2010. 833 p.
- SOBEL, J. D. Recurrent vulvovaginal candidiasis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 214, n. 1, p. 15-21, 2016.
- SOLIS, P. N.; WRIGHT, C. W.; ANDERSON, M. M.; GUPTA, M. P.; PHILLIPSON, J. D. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (Brine Shrimp). **Planta Medica**, v. 59, n. 3, p. 250-252, 1993.
- SOLL, D. R.; DANIELS, K. J. Plasticity of *Candida albicans* biofilms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, p. 565-595, 2016.
- SOUZA, S. M. C.; AQUINO, L. C. M.; MILACH JR, A. C.; BANDEIRA, M. A. M.; NOBRE, M. E. P.; VIANA, G. S. B. Antiinflammatory and antiulcer properties of tannins from *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) in Rodents. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 3, p. 220-225, 2007.
- SOUZA, L. P. **Padronização de extratos vegetais: *Astronium urundeuva* (Anacardiaceae)**. 2012. 94 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Araraquara, 2012.
- SOUZA, A. C. R.; FUCHS, B. B.; PINHATI, H. M. S.; SIQUEIRA, R. A.; HAGEN, F.; MEIS, J. F.; MYLONAKIS, E.; COLOMBO, A. L. *Candida parapsilosis* resistance to fluconazole: molecular mechanisms and *in vivo* impact in infected *Galleria mellonella* Larvae. **Antimicrobials Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 10, p. 6581-6587, 2015.
- SUBRAMANIAN, R.; CHANDRA, M.; YOGAPRIYA, S.; ARAVINDH, S.; PONMURUGAN, K. Isolation of methyl gallate from mango twigs and its anti-biofilm activity. **Journal of Biologically Active Products from Nature**, v. 6, n. 5-6, 2016.
- TEODORO, G. R.; ELLEPOLA, K.; SENEVIRATNE, C. J.; KOGA-ITO, C. Potential use of phenolic acids as anti-*Candida* agents: a review. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015.

- TRENTIN, D. S.; SILVA, D. B.; AMARAL, M. W.; ZIMMER, K. R.; SILVA, M. V.; LOPES, N. P.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Tannins possessing bacteriostatic effect impair *Pseudomonas aeruginosa* adhesion and biofilm formation. **PLoS One**. V. 8, n. 6, p. e66257, 2013.
- VALENTE, L. M. M.; ALVES, F. F.; BEZERRA, G. M.; ALMEIDA, M. B. S.; ROSARIO, S. L.; MAZZEI, J. L.; AVILA, L. A.; SIANI, A. C. Desenvolvimento e aplicação de metodologia por cromatografia em camada delgada para determinação do perfil de alcalóides oxindólicos pentacíclicos nas espécies sul-americanas do gênero *Uncaria*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 216-223, 2006.
- VAN SCHALKWYK, J.; YUDIN, M. H.; Vulvovaginitis: screening for and management of trichomoniasis, vulvovaginal candidiasis, and bacterial vaginosis. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada**, v. 37, n. 3, p. 266-274, 2015.
- WANG, P.; LOMBI, E.; ZHAO, F. J.; KOPITTKE, P. M. Nanotechnology: a new opportunity in plant sciences. **Trends in Plant Science**, v. 21, n. 8, p. 699-712, 2016.
- WENDAKOON, C.; CALDERON, P.; GAGNON, D. Evaluation of selected medicinal plants extracted in different ethanol concentrations for antibacterial activity against human pathogens. **Journal of Medicinally Active Plants**, v. 1, n. 2, p. 60-68, 2012.
- WHALEY, S. G.; BERKOW, E. L.; RYBAK, J. M.; NISHIMOTO, A. T.; BARKER, K. S.; ROGERS, P. D. Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-*albicans Candida* species. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 2173, 2017. doi: 10.3389/fmicb.2016.02173
- WHITE, T. C. Increased mRNA Levels of *ERG16*, *CDR*, and *MDR1* correlate with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with Human Immunodeficiency Virus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 7, p. 1482-1487, 1997.
- WISSING, S. A. et. al. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 9, p. 1257-1272, 2004.
- YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 10, p. 15-105, 2014.
- ZHU, W.; FILLER, S. G. Interactions of *Candida albicans* with Epithelial Cells. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 273-282, 2010.