



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
CURSO DE DOUTORADO**

**DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVO BASEADO EM NANOFIBRAS  
POLIMÉRICAS INCORPORANDO EXTRATO SECO DE *Schinopsis brasiliensis*  
Engler PARA USO ODONTOLÓGICO SOBRE ESPÉCIES DE *CANDIDA*  
CAUSADORAS DE INFECÇÕES ORAIS.**

**BRENNALUISE CAVALCANTI GONDIM CASTELLANO**

**CAMPINA GRANDE – PB**

**2020**

**BRENNA LOUISE CAVALCANTI GONDIM CASTELLANO**

**DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVO BASEADO EM NANOFIBRAS  
POLIMÉRICAS INCORPORANDO EXTRATO SECO DE *Schinopsis brasiliensis*  
Engler PARA USO ODONTOLÓGICO SOBRE ESPÉCIES DE *CANDIDA*  
CAUSADORAS DE INFECÇÕES ORAIS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em odontologia – Área de concentração em Clínica Odontológica.

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dr.<sup>a</sup> Ana Cláudia Dantas de Medeiros

**CAMPINA GRANDE – PB**

**2020**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

C348d Castellano, Brenna Louise Cavalcanti Gondim.  
Desenvolvimento de dispositivo baseado em nanofibras poliméricas incorporando extrato seco de *Schinopsis brasiliensis* Engler para uso odontológico sobre espécies de candida causadoras de infecções orais [manuscrito] / Brenna Louise Cavalcanti Gondim Castellano. - 2020.  
107 p. : il. colorido.  
Digitado.  
Tese (Doutorado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2020.  
"Orientação : Profa. Dra. Ana Cláudia Dantas de Medeiros, Departamento de Farmácia - CCBS."  
1. Estomatite protética. 2. Extratos vegetais. 3. Nanofibras.  
4. Candida spp. I. Título

21. ed. CDD 617.695

**BRENNA LOUISE CAVALCANTI GONDIM CASTELLANO**

**DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVO BASEADO EM NANOFIBRAS  
POLIMÉRICAS INCORPORANDO EXTRATO SECO DE *Schinopsis brasiliensis*  
Engler PARA USO ODONTOLÓGICO SOBRE ESPÉCIES DE *CANDIDA*  
CAUSADORAS DE INFECÇÕES ORAIS.**

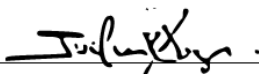
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em odontologia da Universidade Estadual da  
Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do  
título de Doutor em odontologia – Área de  
concentração em Clínica Odontológica.

Aprovada em 23/07/2020

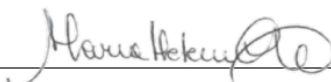
Banca Examinadora



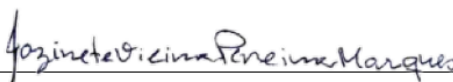
Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro  
Examinador - UFPB



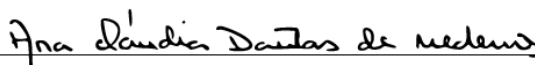
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Joelma Rodrigues de Souza  
Examinador – UFPB



Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão  
Examinador – UEPB



Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Jozinete Vieira Pereira  
Examinador – UEPB



Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Cláudia Dantas de Medeiros  
Orientadora – UEPB

# DEDICATÓRIA

---

*Dedico este trabalho a meus queridos pais, Vera Lúcia e Clodoaldo Calixto e meu amado esposo Lúcio Castellano por todo carinho, incentivo, companheirismo e amor. A vocês meu muito obrigada.*

# AGRADECIMENTOS

---

À **Deus**, por ser o meu refúgio e a minha fortaleza, por ter me dado o dom da vida. Com quem divido todas as minhas alegrias, angústias e aflições. Agradeço por sempre me guiar, por ter abençoado meus caminhos e por me dar força e coragem para enfrentar os desafios da vida.

Aos meus pais, **Clodoaldo Calixto Gondim Filho** e **Vera Lúcia Cavalcanti Gondim**, cuja presença é constante em minha vida e que por vezes sacrificaram seus sonhos em favor dos meus. Agradeço por todo amor, carinho e dedicação, pelos exemplos de pessoas que são para mim e pela excelente educação que me deram, me ensinando a ser um ser humano íntegro, respeitoso e dedicado. Agradeço por nunca medirem esforços para que meus sonhos pudessem ser realizados, pelo apoio e incentivo incondicionais e por sempre acreditarem em mim.

Ao meu amado e dedicado esposo, **Lúcio Roberto Cançado Castellano**, por estar sempre ao meu lado, pelo seu amor, carinho, apoio, companheirismo e compreensão. Por ser um exemplo, para mim, de ser humano e de profissional. Obrigada por ser o melhor esposo e companheiro que Deus poderia me dar, como você mesmo diz: “Somos parceiros para a vida”. Te amo.

À minha querida orientadora, **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Claudia Dantas de Medeiros** pela orientação deste trabalho, por toda confiança, incentivo, disponibilidade e dedicação. Por ser um exemplo de profissional determinada e competente. Desejo que Deus continue abençoando você e sua família.

Aos **professores** e à **coordenação do PPGO/UEPB** pela contribuição acadêmica, competência e dedicação.

À pós-doutoranda e amiga, **Tatiana Rita de Lima Nascimento**, pela ajuda e comprometimento para a confecção das nanofibras e caracterizações, por tornar as atividades mais leves e divertidas. Adoro nossa parceria e espero que perdure para sempre.

À minha amiga **Ingrid Fernandes**, amizade que começou no serviço no PSF Mudança de Vida, seguiu pelo mestrado e agora pelo doutorado. Agradeço pela amizade, carinho, companheirismo e apoio. Por ser uma amiga sempre presente e prestativa. Tenho certeza que nossa amizade já é para toda a vida.

À minha querida amiga **Emanuene Galdino (Manu)**, amiga de pós-graduação. Agradeço imensamente pela amizade e pelo carinho, por ser sempre acessível e me ajudar nas idas e vindas e adaptação em Campina Grande. Saiba que és muito especial para mim

Às **colegas de turma de doutorado**, pelo companheirismo e amizade durante todo o período do curso.

A todos os professores e alunos do **Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio em Medicamentos (LABDEM)** da UEPB pelo companheirismo, disponibilidade e por terem preparado e cedido o extrato utilizado no estudo.

Ao **Laboratório de Materiais e Biosistemas (LAMAB)**, da UFPB, em nome do Prof. Dr. Éliton Souto de Medeiros, pela disponibilidade para a confecção das nanofibras e análise de FTIR.

Ao **Laboratório de Solidificação Rápida (LSR)**, da UFPB, em nome do Prof. Dr. Bruno Guedes, pelo auxílio nas análises de termogravimetria.

Aos colegas do **Laboratório de Cultivo e Análise Celular (LACEC)**, da UFPB, pelo auxílio e disponibilidade nos ensaios biológicos. Com certeza os dias de trabalho e as repetições se tornaram mais leves com a parceria com vocês.

Ao **Laboratório Multiusuário do Instituto de Química**, da Universidade Federal de Uberlândia, em especial ao técnico Flaysner Magayver Portela, por disponibilizar o equipamento e o suporte técnico para experimentos envolvendo microscopia eletrônica,

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, através do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Teranóstica e Nanobiotecnologia (INCT-TeraNano), sob coordenação do Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho (UFU), pelo auxílio financeiro na execução deste projeto.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo auxílio financeiro em forma de bolsa de Doutorado.

Aos **amigos e familiares** pelo incentivo e apoio.

Aos **queridos professores da banca** pela disponibilidade e pelas contribuições para o enriquecimento do trabalho. Saibam que foram escolhidos por toda expertise e competência que representam. Meu muito obrigada.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste sonho. Com vocês compartilho esta conquista e toda minha gratidão.

# RESUMO

---

## RESUMO

**OBJETIVO:** Desenvolver e caracterizar nanofibras poliméricas de PLA/PEG incorporadas com extrato seco da folha da *Schinopsis brasiliensis* Engl. para tratamento de estomatite protética. **METODOLOGIA:** Foram realizadas as determinações da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM) do extrato nebulizado da *S. brasiliensis* frente às cepas de *Candida albicans* ATCC 90028, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. krusei* ATCC 341 e *C. glabrata* ATCC 2001 e sobre três cepas de *C. albicans* e duas de *C. tropicalis* de isolados clínicos, comparando com a nistatina. Para a produção das nanofibras poliméricas, foram preparadas soluções de PLA/PEG (70/30%) em clorofórmio e adicionada a concentração de 10% do extrato nas concentrações de 10X a CIM/2, CIM, CIMx2 e CIM x4. Foi utilizado método de fiação em sopro de solução (SBS). As nanofibras foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), comportamento térmico (TG) e espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR). A ação das nanofibras sobre a cinética de crescimento por contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) foi avaliada sobre inóculo multi-espécies de *C. albicans* ATCC 60193, *C. tropicalis* CBS 94 e *C. krusei* CBS 73. Para os ensaios de biocompatibilidade foi adotada a linhagem de células Vero (ATCC CCL-81). Os dados das curvas de cinética foram analisados por ANOVA One Way, seguida pela comparação múltipla de Tukey post-hoc para cada tempo para avaliar a comparação entre as nanofibras, nistatina e o controle de crescimento. Para os testes de viabilidade celular, foram adotadas as medianas de valores dos grupos testados. As comparações foram realizadas pelo teste de Kruskal Wallis, seguido de Dunn's post hoc ( $\alpha=0.05$ ). **RESULTADOS:** A CIM<sub>88,8%</sub> do *S. brasiliensis* foi de 62,5 µg/mL. A relação CFM/CIM revelou atividade fungicida do extrato para todas as cepas. A morfologia das nanofibras apresentou-se de acordo com o esperado pela técnica SBS em todas as composições testadas. A análise do diâmetro das nanofibras revelou que a adição do extrato da *S. brasiliensis* produziu fibras menos espessas ( $p<0,05$ ) quando comparadas às fibras de PLA/PEG. As fibras PLA/PEG/Bra apresentaram perda de massa em dois estágios. Os espectros que comprovam os grupos funcionais do extrato da *S. brasiliensis*, estão relacionados aos grupos presentes do ácido gálico nos comprimentos de ondas 2926, 1713 e 1265 cm<sup>-1</sup>. A nanofibra PLA/PEG/Bra 2500 foi capaz de reduzir o crescimento fúngico a partir de 4 horas de exposição, se assemelhando ao observado quando comparado à nistatina na concentração de CIM. Todas as nanofibras, nas condições testadas, apresentaram-se citocompatíveis com o uso em mamíferos. **CONCLUSÃO:** Nanofibras poliméricas de PLA/PEG, produzidas por SBS, incorporando extrato da *S. brasiliensis* em diferentes concentrações, mostraram-se biocompatíveis para uso em humanos, sendo capazes de inibir o crescimento de *Candida* spp. Este estudo aponta a potencialidade de aplicação de nanofibras incorporadas com extratos de plantas no controle da estomatite protética.

**Palavras-chaves:** Estomatite sob Prótese. Terapêutica. Extratos Vegetais. Nanofibras. *Candida* spp.



# ABSTRACT

---

## ABSTRACT

**OBJECTIVE:** To develop and characterize polymeric nanofibers of PLA / PEG incorporated with dry leaf extract of *Schinopsis brasiliensis* Engl. for the treatment of prosthetic stomatitis. **METHODOLOGY:** The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicide Concentration (MFC) determinations of extract of the nebulized extract of *S. brasiliensis* against the strains of *Candida albicans* ATCC 90028, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. krusei* ATCC 341 and *C. glabrata* ATCC 2001 and on three strains of *C. albicans* and two strains of *C. tropicalis* from clinical isolates, compared with nystatin. For the production of polymeric nanofibers, solutions of PLA/PEG (70/30%) in chloroform were prepared and the concentration of 10% of the extract was added in the concentrations of 10X to MIC/2, MIC, MICx2 and MICx4. Solution blowing spinning (SBS) method was used. The nanofibers were characterized by scanning electron microscopy (SEM), thermal behavior (TG) and infrared absorption spectroscopy (FTIR). The action of nanofibers on growth kinetics by counting colony-forming units (CFU) was evaluated on multi-species inoculum of *C. albicans* ATCC 60193, *C. tropicalis* CBS 94 and *C. krusei* CBS 73. For biocompatibility assays the Vero cell line (ATCC CCL-81) was adopted. The data of the kinetic curves were analyzed by ANOVA One Way, followed by Tukey's multiple post-hoc comparison for each time to evaluate the comparison between nanofibers, nystatin and growth control. For cell viability tests, the medians of values of the groups tested were adopted. Comparisons were performed using the Kruskal Wallis test, followed by Dunn's post hoc ( $\alpha=0.05$ ). **RESULTS:** The MIC<sub>88.8%</sub> of *S. brasiliensis* was 62.5  $\mu\text{g/mL}$ . The MFC/MIC ratio revealed fungicidal activity of the extract for all strains. The morphology of the nanofibers was as expected by the SBS technique in all tested compositions. The analysis of the nanofibers diameter revealed that the addition of *S. brasiliensis* extract produced less thick fibers ( $p<0.05$ ) when compared to PLA/PEG fibers. The PLA/PEG/Bra fibers showed loss of mass in two stages. The spectra that prove the functional groups of the *S. brasiliensis* extract are related to the groups present in gallic acid in wave-length of 2926, 1713 and 1265  $\text{cm}^{-1}$ . The PLA/PEG/Bra 2500 nanofiber was able to reduce fungal growth after 4 hours of exposure, similar to that observed when compared to nystatin in the MIC concentration. All nanofibers, under the conditions tested, were cytocompatible with use in mammals. **CONCLUSION:** PLA/PEG polymeric nanofibers, produced by SBS, incorporating *S. brasiliensis* extract in different concentrations, proved to be biocompatible for use in humans, being able to inhibit the growth of *Candida spp.* This study points to the potential application of nanofibers incorporated with plant extracts to control prosthetic stomatitis.

**Keywords:** Denture Stomatitis. Therapeutics. Plant Extracts. Nanofibers. *Candida spp.*

# LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ATCC** – American Type Culture Collection

**ATPase** – adenosinatrifosfatase

**ANOVA** – Analysis of variance

**ASD** – Agar Sabouraud Dextrose

**ASTM** – American Society for Testing and Materials

**Bra** – Braúna

**BSD** – backscatter electron detector

**C=O** – carbonila

**C-O-C** – éter

**CAAE** – Certificado de Apresentação de Apreciação Ética

**CAPES** – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

**CBS** – The Dutch Centraalbureau voor Schimmelcultures

**cc** – centímetro cúbico

**CCS** – Centro de Ciências da Saúde

**CEP** – Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos

**CEUA** – Comissão de Ética no Uso de Animais

**CFM** – Concentração Fungicida Mínima

**CH<sub>2</sub>** – metileno ou carbeno

**CH<sub>3</sub>** – metil ou metila

**CH<sub>4</sub>** – metano

**CIM** – Concentração Inibitória Mínima

**CICH<sub>3</sub>** – clorofórmio

**CL<sub>50</sub>** – dose letal mediana

**CLSI** – Clinical & Laboratory Standards Institute

**cm** – centímetro

**CNPq** – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

**CO<sub>2</sub>** – Gás carbônico

**CSD** – caldo Sabouraud Dextrose

**FTIR** – Fourier-transform infrared spectroscopy

**g** – grama

**h** – hora

**HeLa** – Henrietta Lacks

**INCT-TeraNano** – Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Teranóstica e Nanobiotecnologia

**ISO** – International Organization for Standardization

**ISSN** – International Standard Serial Number

**IV** – infravermelho

**K<sup>+</sup>** – potássio

**Kg** – quilograma

**kV** – quilovolt

**LABDEM** - Laboratório de Desenvolvimento e Ensaios de Medicamentos

**MEM** – Meio Essencial Mínimo

**MEV** – microscópio eletrônico de varredura

**µg** – micrograma

**mg** – miligrama

**Mg<sup>2+</sup>** – magnésio

**min** – minuto

**µL** – microlitro

**mL** – mililitro

**mm** – milímetro

**nm** – nanômetro

**mol** – molar

**OH** – hidroxila

**PAN** – poli(acrilonitrila)

**PCL** – poli(ε-caprolactona)

**PDLLA** – Poli (D, L-ácido lático)

**PEG** – poli(etilenoglicol)

**PEO** – poli(óxido de etileno)

**PGA** – poli(ácido glicólico)

**PGLA** – poli(ácido glicólico-ácido lático)

**PLA** – poli(ácido lático)

**PMMA** – poli(metil metacrilato)

**p/p** – peso/peso

**PS** – poliestireno

**Psi** – pound force per square inch

**PVA** – poli(álcool vinílico)

**PVP** – poli(vinil pirrolidona)

**SBF** – soro bovino fetal

**SBS** – solução blow spinning

**SE** – secondary electron

**TTC** – 2,3,5 cloreto de trifenil tetrazólico

**UEPB** – Universidade Estadual da Paraíba

**UFPB** – Universidade Federal da Paraíba

**UFC** – Unidade Formadora de Colônias

**VERO** – *verda reno*

# LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

---

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Imagem da planta *S. brasiliensis*. Fonte: [www.arvoresdobiomacerrado.com.br/site/2017/03/30/schinopsis-brasiliensis-engl/](http://www.arvoresdobiomacerrado.com.br/site/2017/03/30/schinopsis-brasiliensis-engl/) Acesso: 14 de maio de 2020.....23
- Figura 2.** Ilustração da produção de nanofibras. (A) Eletrospinning, (B) Solution Blow Spinning e (C) Air-brushing. Fonte (Nascimento et al., 2019).....27

## Artigo 1

- Fig. (1).** Different nanostructures of plant extracts loaded in nanostructured drug delivery systems.....38

## Artigo 2

- Figura 1.** Caracterização morfológica das nanofibras por MEV.....59
- Figura 2.** Diâmetro médio e dispersão do diâmetro das mantas de nanofibra. (\*) comparação com PLA/PEG, (#) comparação com PLA/PEG/Bra 625.....60
- Figura 3.** Curvas TG, relacionando a perda de massa em função da temperatura. Atmosfera: nitrogênio/argônio e taxa de aquecimento: 10 °C/min.....60
- Figura 4.** Espectros de infravermelho para fibras de PLA/PEG com e sem extrato na região de 4000-400 cm<sup>-1</sup>.....62
- Figura 5.** Cinética de inibição de *Candida spp*.....64
- Figura 6.** Células Vero cultivadas na presença das nanofibras. (A) Controle negativo, (B) controle positivo, (C) PLA/PEG, (D) PLA/PEG/Bra 315, (E) PLA/PEG/Bra 625, (F) PLA/PEG/Bra 1250 e (G) PLA/PEG/Bra 2500.....65
- Figura 7.** Percentual de viabilidade de células Vero cultivadas em presença das nanofibras.....66

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Formulação, dosagem e efeitos dos antifúngicos convencionais. Fonte: Adaptado de (GAD, FOU DA, 2020).....19

### Artigo 1

**Table 1.** Plant extracts loaded in nanostructured drug delivery systems and their application against parasitic and antimicrobial diseases.....43

### Artigo 2

**Tabela 1.** Atividade antifúngica do extrato da *S. brasiliensis* e nistatina sobre *Candida spp.*.....58

**Tabela 2.** Temperaturas de início ( $T_{onset}$ ) e de final ( $T_{endset}$ ) de perda de massa e as degradações em porcentagens (Perda de massa %) das nanofibras PLA/PEG puras ou carreando extrato e *S. brasiliensis* Engl.....61

# SUMÁRIO

---

<b>1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS .....</b>	<b>14</b>
<b>1.1 PERSPECTIVAS MICROBIOLÓGICAS NA FORMAÇÃO E CONTROLE DO BIOFILME DE CANDIDA SPP. ....</b>	<b>16</b>
<b>1.2 TRATAMENTOS ANTIFÚNGICOS E FITOTERÁPICOS .....</b>	<b>18</b>
<b>1.3 SCHINOPSIS BRASILIENSIS ENGL. ....</b>	<b>22</b>
<b>1.4 SISTEMAS NANOMÉTRICOS PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS .....</b>	<b>24</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>30</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	30
<b>3 METODOLOGIA.....</b>	<b>31</b>
<b>3.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO .....</b>	<b>31</b>
<b>3.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO DE S. BRASILIENSIS .....</b>	<b>31</b>
<b>3.3 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM).....</b>	<b>31</b>
<b>3.4 DESENVOLVIMENTO DAS NANOFIBRAS POLIMÉRICAS INCORPORANDO EXTRATO DA S. BRASILIENSIS .....</b>	<b>32</b>
3.4.1 Materiais.....	32
3.4.2 Formulações para dissolução e solubilização do composto PLA/PEG/Bra.....	33
3.4.3 Fiação das nanofibras poliméricas de PLA/PEG incorporando extrato de S. brasiliensis .....	33
<b>3.5 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOFIBRAS POLIMÉRICAS PLA/PEG/BRA .....</b>	<b>33</b>
3.5.1 Morfologia das nanofibras.....	33
3.5.2 Comportamento Térmico.....	34
3.5.3 Estrutura química das nanofibras de PLA/PEG/Bra.....	34
<b>3.6 TESTES BIOLÓGICOS .....</b>	<b>34</b>
3.6.1 Cinética de inibição multiespécies.....	34
3.6.2 Testes <i>in vitro</i> para compatibilidade em linhagens de células Vero .....	35
<b>3.7 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....</b>	<b>35</b>
<b>3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>35</b>
<b>4 ARTIGOS.....</b>	<b>37</b>
4.1 APRESENTAÇÃO .....	37
4.2 ARTIGO PUBLICADO.....	38
4.3 ARTIGO A SER SUBMETIDO .....	50
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>80</b>
<b>6 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>81</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>93</b>

# CONSIDERAÇÕES INICIAIS

---

## 1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

*Candida albicans* é conhecida como um microrganismo comensal no trato digestivo de mamíferos (TONG, TANG, 2017), assim como na cavidade oral dos seres humanos (HU *et al.*, 2019). Outras espécies de *Candida* clinicamente relevantes também são encontradas, como *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei* (HU *et al.*, 2019). É também o fungo patogênico mais comum nos seres humanos, causando infecções das mucosas, especialmente em indivíduos imunocomprometidos (GHOLIZADEH *et al.*, 2016). Vários fatores podem predispor os indivíduos a candidíase, como o tratamento prolongado com antibióticos e corticosteroides, presença de diabetes mellitus, deficiências nutricionais, doenças imunossupressoras ou terapia hormonal (GHOLIZADEH *et al.*, 2016; MENZIES *et al.*, 2018; NISHIMAKI *et al.*, 2019).

O crescimento microbiano sobre a superfície de próteses dentárias resulta da adesão de células microbianas reforçadas pela rugosidade da superfície da prótese e por interações adesivas entre as espécies de *Candida*, principalmente *C. albicans*, e bactérias orais (JAVED *et al.*, 2017). Eles podem induzir uma resposta inflamatória crônica na mucosa oral, descrito como estomatite protética, que se caracteriza por ser a doença infecciosa mais comum que afeta a mucosa oral e é altamente prevalente em indivíduos portadores de prótese dentária (JAVED *et al.*, 2017; VILA *et al.*, 2020).

Nesse contexto, o tratamento das lesões de estomatite protética envolve a orientação da higienização das próteses e da cavidade oral, a remoção de um possível fator irritante (próteses dentárias mal adaptadas e insatisfatórias), o uso de antifúngicos e a confecção de uma nova prótese. Os métodos mecânicos e químicos são frequentemente aconselhados para a higiene das próteses dentárias para evitar colonização de microrganismos.

Os microrganismos presentes em biofilmes apresentam uma resistência elevada aos antifúngicos preconizados para o tratamento dessas afecções e aos sistemas de defesa do hospedeiro, o que muitas vezes resulta em seleção de cepas mais resistentes, levando a infecções persistentes e de difícil tratamento (CABRINI CARMELLO *et al.*, 2019; VEILLEUX, GRENIER, 2019).

Além disso, a patogenicidade e resistência aos fármacos dos fungos presentes no biofilme oral enfatizam a necessidade do desenvolvimento de novos agentes



antimicrobianos. Portanto, o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o tratamento de doenças causadas por *Candida* spp. se faz necessário.

Neste sentido, a utilização de produtos naturais capazes de aplicação clínica é necessário para criar novas estratégias para o controle da candidíase oral devido às desvantagens e insuficiências dos produtos disponíveis comercialmente (GAD, FOU DA, 2020). Produtos naturais são alternativas terapêuticas promissoras, pois tendem a exibir menor intensidade de reações adversas em relação aos antifúngicos de escolha. Notavelmente, o estudo de produtos naturais pode fornecer terapias alternativas, viáveis para o tratamento de doenças bucais (VEILLEUX, GRENIER, 2019).

A espécie *Schinopsis brasiliensis* Engl é uma planta conhecida popularmente como Braúna, Baraúna, entre outros, sendo vastamente encontrada na região da Caatinga (MEDEIROS, ALENCAR, FELISMINO, 2018). Partes da planta como folhas e cascas são bastante utilizadas na medicina popular para fins diversos, como no tratamento da gripe, inflamações e no tratamento de lesões e micoses (DONATI *et al.*, 2015). Além disso, estudos relatam a ação antimicrobiana do extrato *S. brasiliensis* contra patógenos presentes na cavidade oral (FORMIGA FILHO *et al.*, 2015; SARAIVA *et al.*, 2013). A casca e folha desta planta apresentam comprovada atividade antimicrobiana e antifúngica (CHAVES *et al.*, 2015; FERNANDES *et al.*, 2013, 2015, 2016; FORMIGA FILHO *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2012). Além da sua caracterização química e analítica (FORMIGA FILHO *et al.*, 2015; SETTE-DE-SOUZA *et al.*, 2018).

Devido ao fato de muitos produtos naturais apresentarem instabilidade em sua formulação, sua aplicação é limitada. Neste sentido, a utilização de um mecanismo que o imobilize num veículo farmacêutico, seria importante para a sua estabilidade e atividade microbiana (BONAN *et al.*, 2015).

Neste sentido, o controle da liberação de fármacos em sítios de ação específicos, através da utilização de vetores, capazes de permitir a otimização da velocidade de cedência e do regime de dosagem das substâncias, tem sido uma área de intensa pesquisa nos últimos anos (BONAN *et al.*, 2015, 2017; KOU *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2019). Dentre os sistemas vetorizados, os nanomateriais constituídos por polímeros biodegradáveis têm atraído muita atenção dos pesquisadores devido às suas potencialidades terapêuticas, à capacidade de promover uma liberação controlada dependente da degradação de sua matriz polimérica e à maior estabilidade nos fluidos biológicos e durante o armazenamento (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; SOPPIMATH *et al.*, 2001).

Dentre os nanomateriais mais comumente empregados na liberação controlada de fármacos estão as nanopartículas, as nanocápsulas, nanofilmes e nanofibras. As nanofibras, por sua vez, possuem pequenas dimensões e alta área superficial específica, o que favorecem o seu uso para o transporte de portadores de carga através de uma direção controlada (IRANI, MIR MOHAMAD SADEGHI, HARIRIAN, 2017; KARCZEWSKI *et al.*, 2018; NASCIMENTO *et al.*, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2013). São indicadas como dispositivos para liberação controlada de fármacos, dentre os quais encontram-se os medicamentos fitoterápicos e fitoconstituintes (BONAN *et al.*, 2015, 2017; NASCIMENTO *et al.*, 2019; SOUZA *et al.*, 2015).

Levando-se em consideração que as nanofibras podem ser utilizadas como dispositivos ou sistemas de liberação controlada de fármacos e que estes visam manter a concentração do fármaco em níveis terapêuticos por maiores períodos de tempo (BONAN *et al.*, 2015; IRANI, MIR MOHAMAD SADEGHI, HARIRIAN, 2017; KARCZEWSKI *et al.*, 2018; MEDEIROS *et al.*, 2009), estudos que avaliem a ação de nanofibras poliméricas, conjugadas com fármacos ou até mesmo isoladas, sobre *Candida* spp. e sobre o sistema imunológico humano, se fazem importantes. A utilização desses dispositivos para a liberação controlada dos fármacos objetiva reduzir a toxicidade terapêutica. Também permite que concentrações minimamente efetivas atuem constantemente através do contato direto, com ação tópica e com pouca repercussão sistêmica. Diante disso, os Sistemas de liberação controlada têm despertado grande interesse nos últimos anos.

### **1.1 Perspectivas microbiológicas na formação e controle do biofilme de *Candida* spp.**

O gênero *Candida* spp. se apresenta como um conjunto de fungos leveduriformes comensais do corpo humano. Dependendo de inúmeras condições, tais como a imunidade do hospedeiro ou a virulência da cepa fúngica, estes microrganismos podem causar inúmeros danos ao organismo humano. Neste sentido, *Candida* possui vários fatores de virulência que facilitam sua adesão às superfícies da mucosa oral, invasão tecidual e evasão de mecanismos defensivos do hospedeiro (HIROTA *et al.*, 2017; MOYES *et al.*, 2016). A principal espécie patogênica é *Candida albicans*, porém *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. parasilosis* estão se tornando patógenos oportunistas mais importantes em pacientes imunocomprometidos (HU *et al.*, 2019; MÄKINEN *et al.*, 2018; MONTEIRO *et al.*, 2019; MUSHI *et al.*, 2016; PATHIRANA *et al.*, 2019). Além disso, alguns estudos identificaram várias espécies de *Candida* spp. que podem infectar órgãos vitais, incluindo o sistema

nervoso central (LI *et al.*, 2017), devido à sua capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (MARTINS DE ANDRADE *et al.*, 2019; WU *et al.*, 2019).

A formação de biofilme é um fator de virulência importante na patogênese da *C. albicans*. Caracteriza-se por fixação, colonização e desenvolvimento das leveduras, podendo conter, também, pseudo-hifas e matriz extracelular sobre superfícies e substratos orgânicos e inorgânicos (FINKEL, MITCHELL, 2011). A exemplo de um biofilme bacteriano, e em contraste com a dispersão de células planctônicas, o biofilme fúngico pode ser altamente resistente às farmacos antifúngicos. Este é um processo multifatorial e complexo, que envolve: (1) a penetração limitada do fármaco no biofilme devido à alta densidade de matriz extracelular, (2) a absorção da farmacos ou ligação da mesma à matriz extracelular do biofilme, (3) a diminuição da taxa de crescimento, (4) sobre-expressão de genes envolvidos na resistência à fármaco, e (5) tolerância a múltiplas farmacos, devido às células persistentes (FINKEL, MITCHELL, 2011).

O biofilme é considerado como uma camada densa de comunidades microbianas complexas, incorporadas em uma matriz polimérica, que promove interações mutuamente benéficas entre microrganismos e as protege da difusão e ação de agentes antimicrobianos (Peters *et al.*, 2010). A adesão de *Candida* spp. à superfície da resina acrílica, por exemplo, é considerado o primeiro passo na colonização dos tecidos orais, os quais estão expostos à superfície da dentadura (AMIN, REHMAN, ABBAS, 2015).

Estas comunidades microbianas são a principal causa de estomatite protética, problema clínico comum que pode afetar até 70% dos pacientes usuários de prótese (CHAPMAN *et al.*, 2017; MORSE *et al.*, 2018). Esta, por sua vez, caracteriza-se como inflamação moderada ou intensa da mucosa oral, associada ao uso de prótese dentária, ocasionando alterações no tecido, que passa a apresentar hiperemia e edema, acompanhados algumas vezes por petéquias hemorrágicas (JAVED *et al.*, 2017; VILA *et al.*, 2020). A estomatite protética pode ser causada devido à associação de fatores tais como traumatismo da mucosa por ajuste deficiente da prótese; fumo; deficiência ou comprometimento da resposta imunológica; aumento da idade do usuário da prótese; tempo das próteses e má higiene (GENDREAU, LOEWY, 2011; MARTORI *et al.*, 2014).

Além disso, infecções por *Candida* spp., quando não associados ao uso de prótese dentária, são conhecidas por candidose atrófica crônica e podem acometer regiões de tecido mole. Com a ampla aplicação de agentes imunossupressores e antibióticos nos últimos anos, a imunidade geral dos seres humanos diminuiu, a flora se tornou disfuncional, a probabilidade de infecção por fungos na mucosa, pele e vísceras aumentou

significativamente, e a incidência de infecções bucais candidíase aumentou. A candidose atrófica crônica oral pode ocorrer nos lábios, pele e mucosa, e a recorrência é comum, o que traz sofrimento aos pacientes (CORONADO-CASTELLOTE, JIMÉNEZ-SORIANO, 2013). Portanto, essas lesões fúngicas são bastante observadas em indivíduos portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, como também em pacientes que realizam terapia para tratamento do câncer a partir da quimioterapia e radioterapia, com destaque para os tumores malignos da região de cabeça e pescoço (KAWASHITA *et al.*, 2018; TARAPAN *et al.*, 2019).

Como medida de controle da infecção por *Candida* spp. adota-se, no exercício clínico, o uso de medicamentos específicos voltados contra vias metabólicas específicas da célula fúngica. Os medicamentos podem ser sintéticos ou de origem natural, com mecanismos de ação diversos e apresentados sob diferentes formulações (GAD, FOU DA, 2020). Estas variações têm a vantagem de facilitar a escolha por parte dos profissionais odontólogos durante o manejo clínico do paciente. Ainda, deve-se ter em mente que cada formulação pode apresentar vantagens e desvantagens quanto à sua aplicação (tópica ou sistêmica), interferindo na adesão do paciente ao tratamento. Apesar da quantidade relativamente ampla de antifúngicos disponíveis, há a necessidade de se descobrir novas opções terapêuticas e de se desenvolver novos sistemas de liberação dos fármacos. A ampla variação nas opções antifúngicas demanda estudos continuados para que se encontre a melhor escolha para determinada situação clínica.

## **1.2 Tratamentos antifúngicos e fitoterápicos**

Vários agentes antifúngicos orais têm sido empregados no tratamento das infecções por *Candida* spp. que acometem a cavidade oral, podemos citar principalmente fluconazol, nistatina, anfotericina B, miconazol, cetoconazol, itraconazol e clotrimazol (Tabela 1) (BAKHSI *et al.*, 2012; DAVIES *et al.*, 2016; GAD, FOU DA, 2020; GEBREMEDHIN *et al.*, 2014; TSUTSUMI, TAKAKUDA, WAKABAYASHI, 2016).

**Tabela 1.** Formulação, dosagem e efeitos dos antifúngicos convencionais. Fonte: Adaptado de (GAD, FOU DA, 2020).

Antifúngico	Formulação	Dose	Efetividade	Efeitos Adversos
<b>Fluconazol</b>	Comprimidos	50–100 mg/dia	Eficaz; recorrência após 4 semanas	náusea, vômito, diarreia, dor abdominal
	Suspensão	100 mg/mL por dia		
<b>Nistatina</b>	Suspensão, 60 mL	4–6 mL/6 h	Eficaz; cura clínica – 87.5% cura micológica – 66%	Bem tolerado
	Creme, 30 g	2–4 aplicações/dia 2/8 h		Não descrito náusea, vômito, efeitos gastrintestinais
	Comprimidos			
<b>Anfotericina B</b>	Tópico	3 vezes/dia	Eficaz; recorrência após 12 semanas	Efeitos renais, cardiovasculares, medulares e neurológicos
	Infusão	100–200 mg/6 h		
<b>Miconazol</b>	gel, 2%	100 mg/6 h	Eficaz	Não descrito; sensação de ardência, irritação, náusea, diarreia
<b>Cetoconazol</b>	gel, 2%	3 vezes/dia	Eficaz	náusea, vômito, dor abdominal
	Comprimidos	200 mg 1–2 vezes/dia		
	Suspensão, 30 ou 10 cc	200 mg (20 mL) 4 vezes/dia		
<b>Itraconazol</b>	cápsulas	100–200 mg/dia	Eficaz; recorrência em pacientes com higiene oral deficiente	náusea, vômito, diarreia, dor abdominal
<b>Clotrimazol</b>	gel, 1%	3 vezes/dia	Eficaz	irritação em pele, sensação de ardência
	Comprimidos, 10 mg	5 vezes/dia		

Esses antifúngicos possuem mecanismos de ação distintos entre si, ou seja, atacam vias distintas do metabolismo celular fúngico. Alguns derivados de azóis, tais como fluconazol e itraconazol, possuem ação fungistática e atuam preferencialmente nas vias de biossíntese do ergosterol. O alvo principal é a inativação da enzima 14'-lanosterol desmetilase, que por sua vez reduz a conversão de lanosterol em ergosterol dependente de citocromo P450. A diminuição da produção de ergosterol interfere na formação da membrana celular fúngica, causando desequilíbrio na estrutura da membrana, afetando o crescimento e a proliferação celulares (SANGLARD, COSTE, FERRARI, 2009; SHAPIRO, ROBBINS, COWEN, 2011; WHITE, MARR, BOWDEN, 1998). Já os imidazóis (miconazol, oxiconazole, econazol, cetoconazol, tioconazole e clotrimazole), muito utilizados para tratamento de infecções em mucosas, possuem além do mecanismo de depleção do ergosterol, a capacidade de desestabilizar as funções de enzimas ATPase em vacúolos, interferindo no balanço iônico no interior das células fúngicas (ZHANG *et al.*, 2010). O fato de terem ação fungistática, o uso prolongado desses medicamentos pode facilitar a indução

de resistência na população de células fúngicas restantes (SHAPIRO, ROBBINS, COWEN, 2011). Já os polienos, representados por anfotericina B, natamicina e nistatina, atuam ligando-se diretamente ao ergosterol presente na membrana fúngica. Este processo induz a formação de poros, desencadeando desequilíbrio do balanço iônico celular e perda de integridade da membrana, culminando com lise da célula (SANGLARD, COSTE, FERRARI, 2009). Anfotericina B é mais usada em tratamento de infecções sistêmicas (LEMKE, KIDERLEN, KAYSER, 2005; SANGLARD, COSTE, FERRARI, 2009), enquanto que nistatina se mostra mais interessante em aplicações tópicas (VANDEPUTTE, FERRARI, COSTE, 2012).

Apesar da excelente atuação no controle fúngico, vários inconvenientes como toxicidade, interações antagônicas fármaco-fármaco, falta de eficiência fungicida e alto custo são observados quando da utilização desses agentes (BAKHSHI *et al.*, 2012; GAD, FOUDA, 2020; TSUTSUMI, TAKAKUDA, WAKABAYASHI, 2016; WATTIER, STEINBACH, 2018). Além disso, as infecções fúngicas orais geralmente são reincidentes, o que gera ainda mais resistência ao microrganismo quando da necessidade de submeter o paciente a mais uma terapia antifúngica (GAD, FOUDA, 2020; NEPPELENBROEK, 2016). Deste modo, se torna necessária a busca por novas e eficazes alternativas terapêuticas.

As terapias antifúngicas sistêmicas geralmente são ativas contra fungos que são liberados das células dispersas pelo biofilme (células planctônicas), mas são parcialmente eficazes contra biofilmes (SANCHES *et al.*, 2019), além disso, podem apresentar efeitos adversos sistêmicos que geram desconforto ao paciente. Já a aplicação tópica de agentes antifúngicos é eficaz apenas por um curto período de tempo. Além disso, esses agentes geralmente são afetados negativamente pelo constante fluxo salivar, o que impede a permanência do medicamento no local afetado por um período maior de tempo (BAKHSHI *et al.*, 2012; MARTINS, GONTIJO, 2017).

Diante disso, para melhorar os padrões terapêuticos de tratamento das infecções causadas por *Candida*, pesquisas inovadoras são direcionadas para o desenvolvimento de alternativas para o tratamento dessas afecções (GONDIM *et al.*, 2018). Dessa forma, o estudo de extratos vegetais derivados de plantas medicinais pode proporcionar alternativas viáveis e de baixo custo para o tratamento de doenças infecciosas (GONDIM *et al.*, 2019).

Vários produtos naturais têm efeitos antifúngicos e antimicrobianos, que podem ser usados no combate à Candidíase oral (FERREIRA *et al.*, 2015; LAVAEI *et al.*, 2018; MARCOS-ARIAS *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2019). Os produtos naturais são mais baratos, menos tóxicos e menos propensos a induzir resistência microbiana em comparação

com os medicamentos convencionais (FERREIRA *et al.*, 2015; LAVAE *et al.*, 2018). No entanto, alguns desses produtos naturais podem mostrar toxicidade ou causar intolerância; portanto, eles devem ser usados com cautela (CHINSEMBU, 2016; RAO *et al.*, 2019).

Estudos que abordam a atividade de plantas medicinais contra patógenos orais são ferramentas importantes na avaliação das propriedades dos extratos de plantas medicinais quanto à sua capacidade em inibir o crescimento de microrganismos patogênicos, tais como *Candida* spp. (AGHAZADEH *et al.*, 2016; MADUGULA, 2017) As plantas medicinais possuem em sua composição uma série de compostos químicos, que são chamadas de metabólitos secundários e estes são responsáveis em fornecer atividade biológica benéfica à saúde humana. Esses metabólitos são classificados em alcalóides, cumarinas, flavonoides, esteroides, glicosídeos cardioativos, lignanas, óleos essenciais, saponinas, terpenos, entre outros. Cada um destes grupos com características e ações específicas sobre os sistemas biológicos (CRAGG, NEWMAN, 2013; NEWMAN, CRAGG, 2016; SANTOS *et al.*, 2020).

Estudos etnofarmacológicos orientam a busca mundial de novos medicamentos antimicrobianos a partir de plantas medicinais usadas por comunidades tradicionais (SARTORATTO *et al.*, 2004). Neste sentido, no Brasil, foi lançado, em 2009, o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que estimula a pesquisa e o uso da biodiversidade brasileira como promotores de riqueza e como ferramentas para uma melhor inclusão social e melhoria da qualidade da saúde da população (BRASIL, 2009). Propostas como esta reforçam a importância dos recursos naturais como fontes de novas moléculas terapêuticas.

As doenças microbianas têm um profundo impacto econômico na saúde pública, especialmente em regiões tropicais e em pacientes imunodeficientes ou imunodeprimidos. Adicionalmente, apesar da existência de medicamentos poderosos, algumas cepas de microrganismos multirresistentes causam infecções com altas taxas de mortalidade, particularmente em pacientes hospitalizados (NASCIMENTO *et al.*, 2000; STAPLETON *et al.*, 2004; VILA *et al.*, 2020).

Alguns estudos têm enfatizado grandes perspectivas para a utilização de produtos naturais derivados de plantas, no controle de microrganismos presentes na cavidade oral (AHMAD, JAFRI, KHAN, 2020; GAD, FOUDA, 2020; VILA *et al.*, 2020; ZAGO *et al.*, 2019). Neste sentido, substâncias derivadas de plantas medicinais, obtidas por diversas técnicas de extração, de material orgânico advindo de diversas partes das plantas, apresentaram atividade antimicrobiana comprovada, muitas vezes com resultados

aproximando-se do efeito gerado por medicamentos de escolha (MADUGULA, 2017; XU *et al.*, 2019; ZAGO *et al.*, 2019).

Diante disso, estes e outros resultados utilizando extratos com plantas medicinais sugerem que os compostos químicos presentes em várias partes da planta, podem ser importantes alternativas terapêuticas às candidíases orais.

### **1.3 *Schinopsis brasiliensis* Engl.**

A *Schinopsis brasiliensis* Engl pertence à família Anacardiaceae e é uma espécie endêmica do Brasil. As plantas são conhecidas popularmente como baraúna, braúna, braúna parda, braúna-sertão, quebracho ou ainda, na região de Mato Grosso, chamada de chamacoco (Figura 1). É uma planta muito presente no nordeste do Brasil, na região do bioma da Caatinga. Diferentes partes da *S. brasiliensis*, incluindo folhas, casca, caule e fruto, têm sido usadas na medicina popular como agentes anti-inflamatórios para várias doenças, como gripe, febre, tosse, diarreia, impotência e osteoporose (ALBUQUERQUE, 2006; ALBUQUERQUE *et al.*, 2007; ALMEIDA *et al.*, 2005).

Até o momento, existem poucos estudos que confirmem a atividade farmacológica de *S. brasiliensis*, sendo que a maioria está relacionada ao potencial antimicrobiano. Destaca-se a atividade contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus parasanguinis*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* e *C. krusei* dos extratos hidroalcoólicos feitos de casca e folhas de *S. brasiliensis* (FORMIGA FILHO *et al.*, 2015; GUIMARÃES, 2010; JOVITO, 2016; SANTOS, 2013; SARAIVA *et al.*, 2011, 2013; SILVA *et al.*, 2015, 2012) e do extrato etanólico da casca e folhas e suas frações (hexano, metanol, diclorometano e acetato de etila) (MACHADO, 2012; SARAIVA *et al.*, 2011). Por outro lado, o óleo essencial produzido a partir das folhas de *S. brasiliensis* apresentou atividade fraca apenas contra *S. aureus* (DONATI *et al.*, 2015). Outros estudos também demonstraram ação da *S. brasiliensis* contra cepas de microrganismos conhecidamente resistentes aos antibióticos tetraciclina, gentamicina e oxacilina (SARAIVA *et al.*, 2011, 2013) e eritromicina (SILVA *et al.*, 2015).





**Figura 1.** Imagem da planta *S. brasiliensis*. Fonte: [www.arvoresdobiomacerrado.com.br/site/2017/03/30/schinopsis-brasiliensis-engl/](http://www.arvoresdobiomacerrado.com.br/site/2017/03/30/schinopsis-brasiliensis-engl/) Acesso: 14 de maio de 2020.

Estudos apontam que a ação antimicrobiana atribuída ao extrato se deve à presença de constituintes químicos, como os compostos fenólicos, que são encontrados vastamente em espécies vegetais, e atuam como agentes tóxicos aos microrganismos (BATISH *et al.*, 2008). Estudos fitoquímicos preliminares mostraram que a *S. brasiliensis* tem alto teor de compostos fenólicos, como taninos e flavonoides, com maior concentração de taninos, correspondendo a 55% do conteúdo fenólico total (SARAIVA *et al.*, 2011). Em outro estudo, foi identificado, por meio da cromatografia líquida do extrato da *S. brasiliensis*, que o ácido gálico (ácido 3,4,5 – tri-hidroxibenzoico) é o componente majoritário presente na planta (FERNANDES *et al.*, 2015). Acredita-se que este importante polifenol, presente em várias plantas, pode conferir propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas (CORRADINI *et al.*, 2011). Neste sentido, foi demonstrada a atividade antioxidante de extrato metanol e óleo essencial produzidos a partir das folhas de *S. brasiliensis* (DONATI *et al.*, 2015; SARAIVA *et al.*, 2011). Contudo, acredita-se que a ampla variedade de metabólitos que compõem os extratos da *S. brasiliensis*, também pode apresentar efeitos diretos no controle e combate de infecções da cavidade oral. Portanto, assim como em outras plantas medicinais, a parte da planta usada e o tipo de processo de extração são capazes de interferir na composição e na capacidade de ação do produto final (MEDEIROS, ALENCAR, FELISMINO, 2018).

Atividades inseticidas e moluscicidas foram observadas em experimentos usando extratos e frações produzidas com a casca de *S. brasiliensis*. Dentre eles, o extrato seco e a fração clorofórmio apresentaram efeitos diversos em relação ao hexano e acetato de etila

(SANTOS *et al.*, 2014; SILVA, 2011). Extratos de sementes da planta mostraram atividade inseticida, porém com resultados de toxicidade que demandam cuidado quanto ao seu uso em humanos e na natureza (BARBOSA *et al.*, 2014; OLIVEIRA, 2011; SANTOS *et al.*, 2014). Por outro lado, os extratos de casca e folhas, quando administrados oralmente para camundongos, apresentam toxicidade moderada para os animais (SANTOS, 2013).

#### **1.4 Sistemas nanométricos para liberação controlada de fármacos**

Os nanomateriais são uma importante divisão dos biomateriais, apresentando diversificada aplicação na área biomédica. Os nanomateriais podem apresentar diferentes formas tais como partículas, esferas, tubos, filmes, fibras, whiskers entre outras, sendo definidos como os materiais que apresentam pelo menos uma dimensão variando entre 1 e 100 nm (KREYLING, SEMMLER-BEHNKE, CHAUDHRY, 2010). Por apresentarem diferentes formas, podem ser usados em diversas aplicações como sensores, filtros, catalisadores, sistemas para liberação controlada de fármacos, órteses e próteses para aplicações médicas e odontológicas, suporte para crescimento de células e tecidos (NAKHAEI, SHAHTAHMASSEBI, 2015; REDDY, XU, YANG, 2011). Recentemente, a busca por sistemas de liberação de fármacos mais inteligentes e eficientes está sendo realizada com o intuito de melhorar os efeitos terapêuticos e reduzir a toxicidade apresentada pelas formulações convencionais de diversos fármacos (BORASCHI, CASTELLANO, ITALIANI, 2017).

A administração de fármacos ou agentes farmacêuticos a pacientes de maneira fisiologicamente aceitável tem sido sempre uma preocupação na área da saúde humana. O objetivo dos sistemas de administração controlada de fármacos é entregar uma concentração pré-determinada a um alvo particular, ao longo de um período de tempo específico, com comportamento o mais previsível possível (MEDEIROS *et al.*, 2009; MORIE *et al.*, 2016). Novas tecnologias e materiais tem um profundo impacto sobre este processo. Dentre os sistemas vetorizados de liberação de fármacos, os nanomateriais constituídos por polímeros biodegradáveis têm atraído bastante atenção, gerando inúmeras possibilidades de aplicações e usos médico-odontológicos (NASCIMENTO *et al.*, 2019). Estes apresentam degradação resultante primariamente da ação de microrganismos, tais como fungos, bactérias e algas de ocorrência natural, gerando CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, componentes celulares e outros produtos (NASCIMENTO *et al.*, 2019; YADAV *et al.*, 2015). Os polímeros biodegradáveis podem ser agrupados em duas classes principais: naturais e sintéticos.

Os polímeros naturais são formados durante o ciclo de vida de plantas verdes, animais, bactérias e fungos. Os mais conhecidos são colágeno, celulose, polissacarídeos (quitosanas, quitinas e xantanas), ácidos algínicos (ácidos manurônico e gularônico), polipeptídios naturais (gelatinas) e poliésteres bacterianos (GONDIM *et al.*, 2018; NASCIMENTO *et al.*, 2019; YADAV *et al.*, 2015). Apresentam vantagens quanto ao uso em sistemas de liberação controlada de fármacos. Por outro lado, os polímeros sintéticos biodegradáveis têm sido muito empregados em cápsulas de liberação controlada de fármacos, materiais para uso em cirurgias (suturas, clips, pinos para ossos) e para embalagens especiais. Dentre os polímeros sintéticos mais usados estão poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido glicólico-ácido láctico) (PGLA), poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), poli(etilenoglicol) PEG (BONAN *et al.*, 2015, 2017; NASCIMENTO *et al.*, 2019).

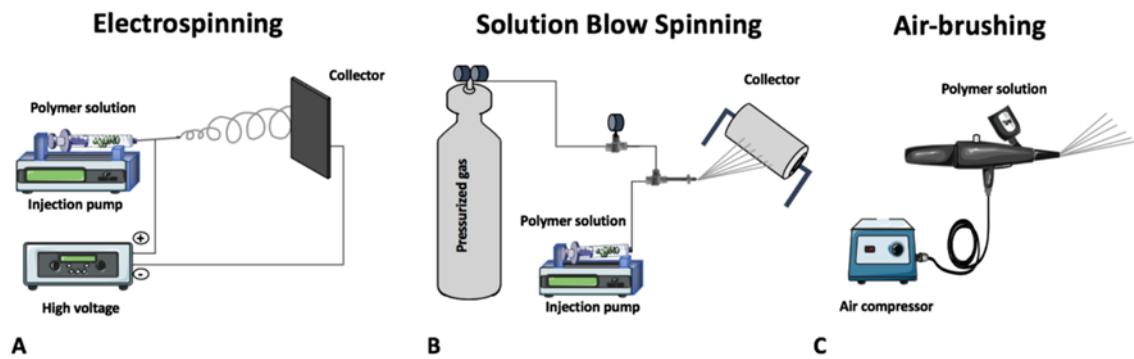
O PLA tem sido amplamente utilizado na engenharia biomédica e de tecidos devido à sua excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade (BHATTARAI *et al.*, 2009; IVANOVA, BAZAKA, CRAWFORD, 2014; LUTZ, HOTH, 2006; XU *et al.*, 2009). Além disso, os produtos de degradação de PLA são conhecidos por serem não tóxicos para os organismos vivos (FATHI-AZARBAYJANI, CHAN, 2010; GUPTA, REVAGADE, HILBORN, 2007; KENAWY *et al.*, 2002). Entretanto, o PLA apresenta algumas limitações, como sua baixa taxa de degradação, em comparação com outros poliésteres e a presença de grupos laterais hidrofóbicos com baixa reatividade. Diante disso, várias técnicas vêm sendo utilizadas para melhorar as propriedades físicas, químicas e biológicas do PLA, sendo a mais comum a formação de blendas do PLA com diferentes outros polímeros que podem ou não ser degradáveis (IVANOVA, BAZAKA, CRAWFORD, 2014; XU *et al.*, 2009). Dentre os polímeros combinados ao PLA, o poly(etileno glicol) (PEG) é um dos mais comumente usados (WANG *et al.*, 2019). Isto se deve, principalmente, às características de biocompatibilidade, baixo custo e fácil processamento, com excelente solubilidade em água e em solventes orgânicos que o PEG apresenta (LUTZ, HOTH, 2006). Ainda, PEG apresenta baixa toxicidade e ausência de imunogenicidade em humanos, além de boa biodegradabilidade e fácil eliminação renal (IVANOVA, BAZAKA, CRAWFORD, 2014). Biomateriais contendo PEG são muito utilizados como sistemas de liberação controlada de fármacos e curativos (NI *et al.*, 2014; ZANDER *et al.*, 2015). As substâncias que podem ser liberadas por sistemas nanométricos podem ser agentes quimioterápicos, antivirais, imunossuppressores, anti-inflamatórios, antimicrobianos, opióides, hormônios, anestésicos e vacinas (ASVADI *et al.*, 2013). Além destes, há um crescente interesse em utilizar os medicamentos fitoterápicos (BONAN *et al.*, 2015, 2017; KUMAR *et al.*, 2010; LIU *et al.*,

2012; YU *et al.*, 2012) administrados por suas propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas e antifúngicas.

Estudos recentes apresentam resultados promissores quanto ao desenvolvimento de nanomateriais poliméricos para o tratamento e prevenção da candidíase oral em pacientes usuários de prótese (AHMAD, JAFRI, KHAN, 2020; GONDIM *et al.*, 2018). Entretanto, a ênfase está na utilização de nanopartículas, deixando clara a necessidade de estudos que abordem o desenvolvimento de novos formatos e tipos de nanomateriais com aplicação promissora na cavidade oral. Por isso, há a importância de se estudar a efetividade de nanofibras poliméricas carreando compostos sintéticos ou mesmo naturais, como os extratos vegetais.

As nanofibras tem apresentado uma variada aplicação nas áreas médica e odontológica (GONDIM *et al.*, 2019; KIM *et al.*, 2009; NASCIMENTO *et al.*, 2019; WILLIAMS, 2009). Possuem propriedades que favorecem o seu uso para o transporte de moléculas portadores de carga por meio de uma direção controlada, sendo bastante indicados como dispositivos de liberação controlada de fármacos. Podem servir como curativos antimicrobianos, arcaçoucos para reparo tecidual ou mesmo como embalagens inteligentes para alimentos e medicamentos (ZHANG, RONCA, MELE, 2017). As mantas de nanofibras podem ser empregadas para este fim, incorporando fármacos como antibióticos, antineoplásicos, analgésicos, anti-inflamatórios não esteróides, antimicrobianos e antifúngicos, além de produtos naturais derivados de plantas (BONAN *et al.*, 2015; GONDIM *et al.*, 2019; NASCIMENTO *et al.*, 2019; TSENG *et al.*, 2013; UHRICH *et al.*, 1999).

Fatores como elevada área superficial, que pode ser 100 vezes maior em comparação às microfibras, e sua arquitetura facilmente controlável (porosidade, diâmetro etc.) favorecem o desenvolvimento dos sistemas baseados em nanofibras. Muitas técnicas para produção de nanofibras foram desenvolvidas ao longo dos anos, dentre elas: eletrospinning, solution blow spinning e air-brushing (Figura 2).



**Figura 2.** Ilustração da produção de nanofibras. (A) Eletrospinning, (B) Solution Blow Spinning e (C) Air-brushing. Fonte (Nascimento et al., 2019).

Cada técnica apresenta limitações quanto ao tamanho da escala das fibras e ao volume total de material produzido (LU *et al.*, 2011; MEDEIROS *et al.*, 2009; NASCIMENTO *et al.*, 2019). A eletrofiação vem sendo a técnica mais utilizada para produzir fibras poliméricas micrométricas, submicrométricas e nanométricas. Entretanto, a baixa taxa de produção e a limitação em relação às propriedades dielétricas da solução de fiação limitam seu uso em escala industrial. Para superar algumas dessas desvantagens, a técnica conhecida como solução blow spinning (SBS) foi desenvolvida para produzir micro e nanofibras em uma escala maior, com taxas de fiação mais altas e custos reduzidos (MEDEIROS *et al.*, 2009). O sistema SBS consiste em bocais concêntricos, através dos quais uma solução de polímero e um gás pressurizado são ejetados simultaneamente. Na ponta do bico, as forças aerodinâmicas de arrasto e cisalhamento, causadas pelo gás pressurizado que sai do bico, são combinadas para formar um cone semelhante ao cone de *Taylor* - este sendo formado na ponta do bico no processo de eletrofiação. As fibras são sopradas da ponta do bico em direção a um coletor colocado a uma distância de trabalho fixa, formando as mantas de nanofibras desejadas (BONAN *et al.*, 2015, 2017; MEDEIROS *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2011; OLIVEIRA, *et al.*, 2013).

Observa-se, ao longo do tempo, um importante aumento no número de sistemas baseados em nanofibras para liberação controlada de produtos derivados de plantas medicinais, direcionados para as mais variadas aplicações (GONDIM *et al.*, 2019). Ressalta-se o uso desses sistemas como curativos e arcabouços de reparo tecidual, potencializando o efeito dos derivados de plantas medicinais na estimulação de proliferação celular, controle de resposta inflamatória, ação antioxidante e ação antimicrobiana (Bonan *et al.*, 2015, 2017; NASCIMENTO *et al.*, 2019; ZHANG, RONCA, MELE, 2017). Direcionados à área médico-

odontológica, observa-se que a produção de nanofibras visa liberação de extratos brutos, frações de extratos, fitoconstituintes isolados e óleos essenciais.

A escolha do tipo de matriz polimérica usada para a confecção das nanofibras deve ser avaliada quanto à interação com as substâncias naturais escolhidas (ZHANG, RONCA, MELE, 2017). A melhor combinação entre polímeros e material a ser carregado facilita a geração de um sistema com melhor capacidade de controle da liberação dos compostos, garantindo uma prolongada ação antimicrobiana e menores níveis de toxicidade ao paciente em uso dos dispositivos. Nanofibras poliméricas carregando fármacos de ação antifúngica, especificamente anti-*Candida* spp., vem sendo desenvolvidas ao longo dos anos. A grande maioria dos produtos são desenvolvidos usando a técnica de electrospinning para entrega de fármacos sintéticos comerciais. Têm sido usados os polímeros poli(vinil pirrolidona) (PVP), poli(metil metacrilato) (PMMA), quitosana, poli(óxido de etileno) (PEO), poli(álcool vinílico) (PVA), poliacrilonitrila (PAN), zeína, goma-laca, poly( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), poliestireno (PS), ciclodextrina. Em composição com estes polímeros estão fármacos como fluconazol, anfotericina B, cloreto de cetilpiridínio, voriconazol e clotrimazol (ESENTÜRK *et al.*, 2020; KARIMI *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2014; SHARMA *et al.*, 2016; SIRELKHATIM *et al.*, 2019; TONGLAIROUM *et al.*, 2014, 2015). Por outro lado, é crescente número de propostas de nanofibras poliméricas carregando compostos de origem natural para controle de infecção por *Candida* spp. (GONDIM *et al.*, 2019; PILEHVAR-SOLTANAHMADI *et al.*, 2017). Neste contexto, ainda por técnica de electrospinning, as nanofibras mais promissoras foram desenvolvidas para o carregamento de extratos de *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert (MOTEALEH *et al.*, 2014), do fitoconstituente eugenol (SEMNANI *et al.*, 2018), do composto monolaurina (CHINATANGKUL *et al.*, 2018), da fração etanólica de extrato de própolis (MORADKHANNEJHAD *et al.*, 2018), de peptídeos antimicrobianos derivados de animais marinhos (VIANA *et al.*, 2015) e de óleos essenciais de *Piper betle* L. e de *Syzygium aromaticum* (TONGLAIROUM *et al.*, 2016). Em todos os estudos observou-se a vantagem da liberação controlada dos compostos sintéticos ou naturais, reforçando a aplicabilidade de nanofibras poliméricas como modelos de sistemas terapêuticos para controle de infecções crônicas por *Candida* spp. Entretanto, não se observam trabalhos adotando a técnica de SBS para produção de nanofibras poliméricas para a liberação de produtos naturais derivados de plantas, em especial do bioma Caatinga do Brasil. O uso desses sistemas pode ser explorado na Odontologia, principalmente, nas áreas de prótese, cariologia, periodontia, implantodontia, cirurgia buco-maxilo-facial e endodontia.

A investigação extensiva sobre sistemas de distribuição de fármacos tem sido realizada para melhorar os efeitos terapêuticos e para reduzir a toxicidade das formas de dosagem convencionais. Sendo assim, o desenvolvimento de uma nanofibra polimérica, incorporando produto natural para a utilização como um possível agente terapêutico no tratamento de agravos provocados por *Candida* spp. em pacientes usuários de prótese se torna bastante relevante.

# OBJETIVOS

---

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar nanofibras poliméricas de PLA/PEG incorporadas com extrato seco nebulizado da folha da *Schinopsis brasiliensis* Engler e avaliar a atividade biológica sobre o gênero *Candida* spp. e citocompatibilidade.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do extrato nebulizado da folha de *S. brasiliensis* sobre espécies do gênero *Candida*.
- b) Produzir nanofibras poliméricas de PLA/PEG incorporando o extrato da *S. brasiliensis* usando a técnica de Solution Blow Spinning-SBS.
- c) Caracterizar as nanofibras poliméricas de PLA/PEG incorporando extrato *S. brasiliensis* através de ensaios físico-químicos e de imagem.
- d) Avaliar o efeito das nanofibras poliméricas de PLA/PEG incorporando extrato *S. brasiliensis* na cinética de inibição multi-espécie de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* nos tempos de 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24h através da contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC).
- e) Avaliar a citocompatibilidade *in vitro* das nanofibras poliméricas de PLA/PEG incorporando extrato *S. brasiliensis* em linhagens de células VERO.



# METODOLOGIA

---

## 3 METODOLOGIA

### 3.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo com abordagem indutiva com procedimento comparativo-estatístico por meio da técnica de observação direta intensiva em laboratório.

### 3.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO DE *S. brasiliensis*

O extrato nebulizado da folha da *S. brasiliensis* Engl. foi preparado pelo Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos (LABDEM) da Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, Paraíba e depositadas no herbarium Professor Jayme Coelho (Herbarium Code EAN) da Universidade Federal da Paraíba sob o número EAN-14049. O extrato então foi gentilmente cedido para o uso neste projeto e as caracterizações dos extratos encontram-se publicados em (FERNANDES *et al.*, 2015).

### 3.3 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)

Inicialmente, o extrato da folha da *S. brasiliensis* foi submetido a testes microbiológicos para definir as concentrações capazes de inibir o crescimento e o desenvolvimento dos fungos. Para tanto, a determinação da CIM dos extratos foi realizada contra cepas de *Candida albicans* ATCC 90028, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. krusei* ATCC 341 e *C. glabrata* ATCC 2001 e sobre três cepas de *C. albicans* e duas de *C. tropicalis* de isolados clínicos de paciente com mucosite oral cedidos pelo Laboratório de Farmacologia Experimental e Cultivo Celular – CCS/UFPB utilizando a técnica da microdiluição descrito pelo *Laboratory and Standards Institute* (CLSI, 2008). Inicialmente, foram distribuídos 100 µL de caldo Sabouraud Dextrose (CSD) (KASVI, Curitiba, PR, Brasil) nos orifícios das placas de microdiluição. Em seguida, 100 µL das soluções teste, extrato na concentração inicial de 4 mg/mL e Nistatina com concentração inicial de 96 µg/mL foram distribuídos em cada poço e diluído seriadamente, a partir da retirada de uma alíquota de 100 µL da cavidade mais concentrada para a cavidade sucessora. Nos orifícios de cada coluna foram dispensadas alíquotas de 100 µL do inóculo, padronizado em espectrofotômetro, no comprimento de onda

de 530 nm, o qual corresponde a concentração de  $2,5 \times 10^3$  CFU/mL (FREIRES *et al.*, 2014; GONDIM *et al.*, 2018).

Como controle negativo foi utilizado o ácido gálico. Paralelamente, foram realizados o controle da viabilidade da cepa (controle de crescimento) e o controle de esterilidade do meio. O ensaio foi realizado em triplicata, e as placas de microdiluição foram incubadas em estufa por 48h a 35°C. A leitura para determinação da CIM das soluções foi feita pelo método visual, levando-se em consideração a formação ou não de aglomerados de células (“botão”) no fundo dos poços. Dessa forma, a CIM foi considerada a menor concentração capaz de inibir visivelmente o crescimento das leveduras utilizadas no ensaio. Para confirmação da presença de microrganismos viáveis ou não nas concentrações inibitórias foi utilizado o corante TTC (2,3,5 cloreto de trifetil tetrazólico) (DINÂMICA, São Paulo, Brasil) no volume de 10 µL (GONDIM *et al.*, 2018). Tal corante é capaz de refletir a atividade de enzimas desidrogenases, envolvidas no processo de respiração celular, o que torna possível a identificação de amostras viáveis, coradas em vermelho, das não viáveis que mantêm a coloração original (KUN, 1951; NICKERSON, MERKEL, 1953).

A CFM foi determinada após a leitura de CIM, coletando alíquotas de 50 µL das subculturas correspondentes ao CIM, CIM x 2 e CIM x 4 e inserindo-as em placas de Petri contendo o Agar Sabouraud Dextrose (ASD) (KASVI, Curitiba, PR, Brasil). As placas foram incubadas a 35°C por 24 h. O CFM foi considerado a menor concentração das soluções que não permitiram crescimento visível na subcultura. A relação CFM / CIM foi calculada e determinou-se o efeito fungistático (CFM / CIM  $\geq$  4) ou fungicida (CFM / CIM  $<$ 4) de cada solução (GONDIM *et al.*, 2018; MAYER, WILSON, HUBE, 2013).

### **3.4 DESENVOLVIMENTO DAS NANOFIBRAS POLIMÉRICAS INCORPORANDO EXTRATO DA *S. brasiliensis***

#### **3.4.1 Materiais**

Para a confecção das nanofibras foram utilizados os polímeros: Poli (D, L-ácido láctico), PDLLA, (PLA 4060D, Massa Molar =  $120 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) e poli (etilenoglicol) PEG foram obtidos de Jamplast, MO, USA, em forma de pellets. Clorofórmio ( $\text{ClCH}_3$ , > 98% pureza), obtido da Sigma Aldrich, BR. Como solvente, foi usado o Clorofórmio ( $\text{ClCH}_3$ ), com > 98% pureza (Sigma Aldrich, Brasil).

### 3.4.2 Formulações para dissolução e solubilização do composto PLA/PEG/Bra

As formulações foram preparadas seguindo metodologia proposta por Bonan et al., (2015). Previamente, uma solução estoque foi preparada solubilizando PLA (15% m/v) em clorofórmio. Adicionou-se PEG à 30% (p/p) em relação ao PLA (base seca). Posteriormente, foram adicionadas as proporções de extratos da planta. Foi utilizado uma concentração de 10% de volume final do extrato da *S. brasiliensis* nas concentrações de 315, 625, 1250 e 2500 µg/mL que correspondem aos valores de 10X a CIM/2, CIM, CIMx2 e CIM x4 (Item 3.3).

### 3.4.3 Fiação das nanofibras poliméricas de PLA/PEG incorporando extrato de *S. brasiliensis*

Para a produção das fibras poliméricas, foi utilizada a tecnologia de SBS, que consistia em um sistema de fiação (bocais concêntricos com um comprimento de protrusão de 0,5 mm), uma bomba de injeção de polímero (bomba do aparelho Harvard 11), um coletor e uma fonte de ar comprimido (Chiaperini MC 124L 7.6-2HP) (KAMYAR *et al.*, 2018; MEDEIROS *et al.*, 2009). As soluções de PLA/PEG/Bra foram fiadas conforme mencionado por (ALWATTAR *et al.*, 2019). Então as soluções de 10% de *S. brasiliensis* de extrato da planta nas concentrações de 315, 625, 1250 e 2500 µg/mL em PLA produziram fibras por SBS convencional. Para a fiação, foram adotados os seguintes parâmetros: bico interno de 1,2 mm de diâmetro, tubo de saída para ar comprimido de 2 mm, distância de trabalho de 15 cm, pressão de 30 Psi, taxa de fluxo de 7,2 mL/h, distância de trabalho do coletor de 200 mm (OLIVEIRA *et al.*, 2013; PARIZE *et al.*, 2016).

## 3.5 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOFIBRAS POLIMÉRICAS PLA/PEG/Bra

### 3.5.1 Morfologia das nanofibras

A morfologia da superfície das fibras foi investigada usando Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV Tescan modelo Vega3 LMU), em parceria com o Laboratório Multiusuário do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil. Cada amostra foi recoberta com 8 nm de camada de ouro para materiais não condutores (Gatan Model 682 Precision Etching Coating System, USA). Para cada amostra, as imagens foram obtidas utilizando detectores secundários (SE) e retroespalhados (BSD), com ampliações de 100, 500, 1.000, 5.000 e 10.000, 3-8 kV voltagem de aceleração do feixe de elétrons e *spot size* 1-3 para prevenir a deformação da amostra. Os diâmetros médios de 100 fibras foram contados utilizando o software ImageJ (MEDEIROS *et al.*, 2009).

### 3.5.2 Comportamento Térmico

Experimentos com as nanofibras de PLA/PEG/Bra foram realizados em analisador termogravimétrico (DTG-60, Shimadzu, Alemanha), sob atmosfera de nitrogênio, e taxa de fluxo de  $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . As amostras foram submetidas à temperatura de  $600^\circ\text{C}$  e taxa de varredura de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ , usando cadinhos de platina (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Análises de Termogravimetria (TG) foi realizada em equipamento DTG-60 (Shimadzu, Alemanha), empregando regime de aquecimento dinâmico no ar para garantir a remoção da fase orgânica. As amostras contendo 10 mg, cada, foram aquecidas a  $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  a  $600^\circ\text{C}$ .

### 3.5.3 Estrutura química das nanofibras de PLA/PEG/Bra

Espectros de Infravermelho (IV) das fibras foram registrados no espectrômetro IRAffinity-1/FTIR-8000 (Shimadzu, Alemanha), em modo de refletância à temperatura ambiente. Todas as amostras foram escaneadas na região de  $4000$  para  $400 \text{ cm}^{-1}$  com uma resolução de  $4 \text{ cm}^{-1}$  (LIU *et al.*, 2014). Os espectros foram tirados de uma média de 40 varreduras para cada amostra, com 3 repetições por amostra (BILBAO-SAINZ *et al.*, 2014).

## 3.6 TESTES BIOLÓGICOS

### 3.6.1 Cinética de inibição multiespécies

Para desenvolver o inóculo multiespécies foram utilizadas *C. albicans* ATCC 60193, *C. tropicalis* CBS 94 e *C. krusei* CBS 73. Os microrganismos foram cultivados em meio CSD (KASVI, Curitiba, PR, Brasil) à  $35^\circ\text{C}$  por 24h e o número de células foi ajustado para aproximadamente  $2 \times 10^3$  UFC/mL. Em seguida, a suspensão final foi preparada misturando volume igual de 5 mL de cada inóculo em um tubo de vidro. As células fúngicas foram então incubadas em placas de 96 poços, de acordo com a técnica de microdiluição, às quais foram adicionadas 10 mg das nanofibras poliméricas sem e com os extratos nas concentrações 315, 625, 1250 e 2500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , sendo incubadas a  $35^\circ\text{C}$  por 24 h. Ao longo das 24h de incubação, alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  de cada amostra testada foram coletadas e semeadas em placas de ASD em intervalos de tempo predeterminados (0, 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas) e incubadas a  $35^\circ\text{C}$  por 24 h. Controles de esterilidade do meio de cultura e viabilidade de levedura também foram realizados. O número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) viáveis foi contado e os valores foram expressos em  $\log$  UFC/mL. Os resultados foram representados

graficamente a curva de morte celular dos fungos em função do tempo. Os testes foram realizados em triplicata (GONDIM *et al.*, 2018).

### 3.6.2 Testes *in vitro* para compatibilidade em linhagens de células Vero

Para os ensaios de biocompatibilidade foi adotada a linhagem de células Vero (ATCC CCL-81) (ASTM, 2012; ISO, 2009). As células foram mantidas em Meio Essencial Mínimo (MEM) suplementado com 10% soro bovino fetal (SBF), 1% Penicilina/Estreptomicina, a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Os repasses de cultivos foram feitos a cada 48h em frascos de cultivo estéreis. As células foram resuspendidas à uma concentração de 2,5 x 10<sup>5</sup> células/mL e cultivadas a 35°C, 5% de CO<sub>2</sub>, na presença ou ausência das nanofibras produzidos. Foram utilizados como controles do teste as nanofibras sem extrato e etanol 70% (controle de morte celular). Os cultivos foram mantidos em contato com os materiais por 24h para avaliação da viabilidade celular (LOUIS, SIEGEL, 2011). Foi realizada a contagem do número total de células viáveis e não viáveis em cada quadrante da câmara de Neubauer. A média foi calculada e multiplicada por 10<sup>4</sup> para obter o número de células por mL de amostra. Em seguida o valor foi multiplicado por 2 para corrigir a diluição da amostra no corante azul de tripan. A determinação do percentual de células viáveis foi calculada seguindo:

$$\% \text{ Células Viáveis} = \frac{\text{Número de células viáveis}}{\text{Número total de células}}$$

## 3.7 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

As linhagens clínicas de *Candida* spp. foram coletadas anteriormente em projeto aprovado por CEP (protocolo CAAE: 43911715.8.0000.5188). O uso de linhagens comerciais de células Vero (ATCC CCL-81) cultivadas e mantidas em laboratório, o que dispensa aprovação em Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (CEP), assim como dispensa avaliação de Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

## 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das curvas de cinética foram analisados por ANOVA *One Way*, seguida pela comparação múltipla de *Tukey post-hoc* para cada tempo para avaliar a comparação

entre as nanofibras, nistatina e o controle de crescimento. Para os resultados dos testes de diâmetro das nanofibras e viabilidade celular foram apresentados como mediana de valores dos grupos testados. As comparações foram realizadas pelo teste de *Kruskal Wallis*, seguido de *Dunn's post hoc* ( $\alpha=0.05$ ), usando software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## 4 ARTIGOS

### 4.1 APRESENTAÇÃO

O projeto de pesquisa foi desenvolvido e aprovado em qualificação pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPB. Mediante execução desse projeto, dois artigos são apresentados nesta tese:

#### **1. PLANT EXTRACTS-LOADED IN NANOSTRUCTURED DRUG DELIVERY SYSTEMS AS ALTERNATIVES FOR THE TREATMENT OF PARASITIC AND ANTIMICROBIAL DISEASES.**

O artigo publicado no periódico *Current Pharmaceutical Design* (ISSN: 1381-6128; Fator de impacto: 2.412; Qualis /Referência A3).

#### **2. DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVO BASEADO EM NANOFIBRAS POLIMÉRICAS INCORPORANDO EXTRATO SECO DE *Schinopsis brasiliensis* Engler PARA TRATAMENTO DE ESTOMATITE PROTÉTICA.**

O artigo será submetido ao periódico *Archives of Oral Biology* (ISSN: 0003-9969; Fator de impacto: 1.663; Qualis /Referência A1), cujas normas para submissão de trabalhos são apresentadas no Anexo A.

## 4.2 ARTIGO PUBLICADO

Send Orders for Reprints to [reprints@benthamscience.net](mailto:reprints@benthamscience.net)

Current Pharmaceutical Design, 2019, 25, 1-12

1

## REVIEW ARTICLE

## Plant Extracts Loaded in Nanostructured Drug Delivery Systems for Treating Parasitic and Antimicrobial Diseases

Brenna Louise C. Gondim<sup>1,2</sup>, João A. Oshiro-Júnior<sup>1</sup>, Felipe Hugo A. Fernandes<sup>1</sup>, Fernanda P. Nóbrega<sup>1</sup>, Lúcio Roberto C. Castellano<sup>2</sup> and Ana Cláudia Dantas Medeiros<sup>1,\*</sup><sup>1</sup>Laboratório de Desenvolvimento e Ensaios de Medicamentos, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, R. Baraúnas, 351, Cidade Universitária, Campina Grande, Paraíba, 58429-500, Brasil. <sup>2</sup>Grupo de Estudos e Pesquisas em Imunologia Humana, Escola Técnica de Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil

## ARTICLE HISTORY

Received: May 26, 2019  
Accepted: June 19, 2019

DOI:

10.2174/138161282566190628153755

**Abstract: Background:** Plant extracts loaded in nanostructured drug delivery systems (NDDSs) have been reported as an alternative to current therapies for treating parasitic and antimicrobial diseases. Among their advantages, plant extracts in NDDSs increase the stability of the drugs against environmental factors by promoting protection against oxygen, humidity, and light, among other factors; improve the solubility of hydrophobic compounds; enhance the low absorption of the active components of the extracts (i.e., biopharmaceutical classification II), which results in greater bioavailability; and control the release rate of the substances, which is fundamental to improving the therapeutic effectiveness. In this review, we present the most recent data on NDDSs using plant extracts and report results obtained from studies related to in vitro and in vivo biological activities.**Keywords:** Parasitic and antimicrobial resistance, plant extracts, nanostructured drug delivery systems.

## 1. INTRODUCTION

Parasitic and antimicrobial resistance is a serious problem for public health worldwide [1]. The World Health Organization (2017) has reported that, each year, drug resistance is responsible for the deaths of approximately 700,000 people of all ages worldwide and that the annual figure might reach 10 million by 2050 [2]. Evidence also indicates that the phenomenon could relate to the increasingly widespread use of broad-spectrum antibiotics, which contributes to the generation of resistant strains [3].

Hospital environments already report greater expenses in overcoming the resistance acquired by bacteria of the genus *Staphylococcus* using last-generation antibiotics [4]. For fungal infections, the problem of increased resistance is also alarming. In fact, the rise in the number of fatalities associated with antifungal-resistant *Candida* strains in many hospitals worldwide highlights the urgent need for newer therapeutic strategies [5]. Another set of problems are the side effects of treatments that can cause hepatotoxicity, gastric irritation, nausea, vomiting, diarrhea, a metallic taste in the mouth, and others [3,4]. Similar to bacterial and fungal infections, parasitic infections are also becoming extremely difficult to solve, and many reports in the literature demonstrate the emergence of parasite resistance to conventional drugs, especially among *Leishmania* spp. and *Plasmodium* spp., as well as the appearance of unusual cases when parasitic infections are associated with immunocompromising conditions [6].

To improve therapeutic standards, innovative research has been directed toward developing alternatives for treating parasitic and antimicrobial diseases. As one possibility, plant extracts (PEs) might overcome the stated obstacles to successfully treat infectious diseases [7]. Notably, PEs are composed of a series of chemical

compounds called “secondary metabolites” that are responsible for several biological activities. Secondary metabolites can be classified into alkaloids, coumarins, flavonoids, steroids, cardioactive glycosides, lignans, essential oils, saponins, and terpenes, among others, all with specific characteristics and actions in relation to biological systems [8]. PEs thus possess advantages compared to synthetic drugs; not only are they safer, more cost-effective, easier to obtain and prepare, more available, and more effective, but they also tend to cause lesser adverse effects [9,10].

However, to date, most natural products have demonstrated elevated instability and poor oral bioavailability, both of which limit their potential in medical formulations [11]. In response, a nanotechnology-based strategy that might circumvent those drawbacks is the incorporation of PEs into nanostructured drug delivery systems (NDDSs), which exhibit physicochemical and biological properties that differ from those observed at the microscale, including improved optical properties, large contact surfaces (i.e., greater area-to-volume ratio), better conductivity, and enhanced interaction with biological molecules [12,13]. In addition, they increase the stability of PEs within live organisms, effectively modulating release kinetics, reduce toxicity, incorporate hydrophobic drugs, and offer immune tolerance and ease of permeation [14,15].

The relationship between NDDSs and PEs can be explored in two distinct ways [16]. On the one hand, PEs can be applied in synthesizing metallic nanoparticles, including of silver, gold, zinc, and titanium, by using extracts obtained from plants such as *Acorus calamus*, *Boerhaavia diffusa*, *Tribulus terrestris*, *Aloe vera*, hybrid *Eucalyptus* spp., *Memecylon edule*, *Malva sylvestris*, *Citrus sinensis*, and *Vachellia rigidula* [17–21]. Such applications are called “green chemistry pathways.” However, information about using natural products as modifiers to produce polymeric nanoparticles currently remains unavailable. On the other hand, using nanotechnology-based systems to improve the biopharmaceutical and technological properties of PEs is also possible. As a result of such applications, PEs might benefit from protection against their de-

\*Address correspondence to this author at the Laboratório de Desenvolvimento e Ensaios de Medicamentos, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, R. Baraúnas, 351, Cidade Universitária, Campina Grande, Paraíba, 58429-500, Brasil; Tel/Fax: +55 83 3315 3300; Ext: 3516; E-mail: [anaclaudia@uepb.edu.br](mailto:anaclaudia@uepb.edu.br)



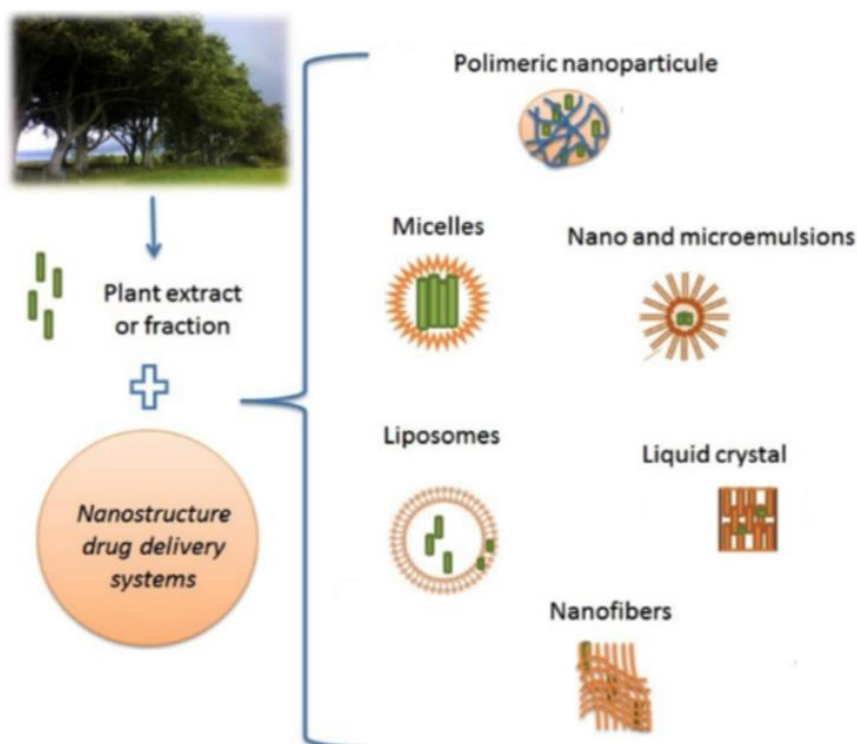


Fig. (1). Different nanostructures of plant extracts loaded in nanostructured drug delivery systems.

gradability in contact with living organisms due to variation in pH or specific enzyme activities [22].

In either case, NDDSs with biodegradable polymers have attracted great attention from researchers because of their therapeutic potential, their ability to promote controlled release depending on the degradation rate of their polymeric matrix, and their exceptional stability in biological fluids and during storage [23,24]. Indeed, research at different stages has associated the diversity of the biological activities of PEs and the advantages offered by NDDSs in formulations developed for potential application in medicine and cosmetics [25]. The most studied NDDSs for that purpose involve polymer nanoparticles, micelles, nanofibers, nano- and microemulsion, and liquid crystals (LCs), among others, for rational alternative therapeutic options. Fig. 1 illustrates the different nanostructures of PEs loaded in NDDSs.

During the past 5 years, searching for published work containing the terms "Nanosystems" and "Plant extract" (ScienceDirect.com, accessed on April 18, 2019) irrespective of time yielded 555 papers that use those terms in their abstracts, titles, or keywords [26]. Among them, only 23 papers remained when the search term "Parasitic infection" was added. Considering the novelty and possible importance of using PEs in NDDSs, in this review we summarize applications of PEs loaded in NDDS as alternatives to current therapies for treating parasitic and microbial diseases. Herein, we present the most recent data on using NDDS with PEs and report results obtained from studies related to both *in vivo* and *in vitro* biological activities.

## 2. PLANT EXTRACTS LOADED IN NANOSTRUCTURED DRUG DELIVERY SYSTEMS

The technological development of pharmaceutical forms with PEs presents numerous limitations that can compromise the stabil-

ity and effectiveness of treatments. As a means to overcome those limitations, using nanotechnology to encapsulate the assets of different nanostructured systems should be considered [27].

This section introduces NDDSs loaded with PEs that have shown effectiveness against different parasites and microorganisms. Reservoir NDDSs are systems in which the drug is separated from the dissolution medium through a coating, membrane, or simply an interface, any of which need to be transposed to release the drug into the medium in order to provide a dimensionally restricted environment with particular properties. Such NDDSs are capable of binding or associating with molecules from different drug groups to achieve solubilization and stability by promoting protection against oxygen, humidity, and light, as well as improving the low absorption of the active components of the extracts (i.e., biopharmaceutical classification II). Such activity can result in the greater bioavailability and controlled release of the substances [11,23,28]. The release profile of the active principles in those systems depends upon the excipients used in their development and can be controlled by various mechanisms, including diffusion, swelling, erosion, and the association of two or more of those mechanisms [29]. Despite those advantages, few reports appear in the literature on PE-loaded nanosystems for antiparasitic and antimicrobial treatment. Often, those approaches with PEs have been investigated in cosmetic formulations [30,31].

### 2.1. Polymeric Nanoparticles

Polymeric nanoparticles (PNs) are divided into nanocapsules and nanospheres. On the one hand, nanocapsules are formed by a polymeric coating around an aqueous or oily core into which the drug can be dissolved in or adsorbed to the polymer coating. On the other, nanospheres are polymer matrices in which the drug can be retained or adsorbed [32,33]. The sizes of PNs vary from 50 to

1,000 nm defined by the morphology and structure of the polymer [34]. The decreasing particle size in the system improves dissolution and solubilization due to the increased surface area [35].

Rajendran *et al.* (2013) studied extracts of the leaves of *Ocimum sanctum* incorporated in PNs approximately 33 nm in size with the aim of improving antimicrobial therapy against four bacteria—Gram-positive *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* as well as Gram-negative *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*—and two fungi—*Aspergillus niger* and *Penicillium* spp. The system was prepared with the cation-induced and -controlled gelification of alginate. *In vitro* antimicrobial activity demonstrated that when incorporated in PNs, extracts exhibited significantly more microbial activity than extracts without PNs. For example, PNs in extracts showed complete reduction against all micro-organisms except *E. coli* (98%), whereas extracts obtained against *Bacillus cereus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, and *S. aureus* achieved reductions of 72%, 81%, 92%, and 98%, respectively. Such promising results of extracts in PNs indicate an important increase in the effectiveness of antimicrobial therapy by reducing the side effects of traditional treatments [36].

Although the first choice for many patients is artemisinin-based therapy, the emergence and spread of drug-resistant parasites have aggravated the incidence of malaria worldwide. Another problem is that artemisinin, as a sesquiterpene lactone isolated from the plant *Artemisia annua* L., has limited bioavailability and tolerability in humans [37].

To ameliorate artemisinin and artemisinin-derived pharmacokinetics, a NDDS was proposed in which the artemether compound was complexed with the polymer (i.e., poloxamer 188) to form lipid nanospheres and nanoparticles. In an *in vitro* drug release study performed at 7.4 and 6.5 pH, results after 72 h showed that the release was approximately 20% and 35%, respectively, which confirms the potential for controlled drug delivery [38].

In another study, lecithin–chitosan nanoparticles were used to encapsulate, stabilize, and deliver artemisinin *in vitro* and *in vivo*. Improved antimalarial activity and a higher survival rate were observed in a BALB/c experimental model of *Plasmodium berghei* infection. However, additional studies remain necessary to evaluate the safety and tolerability of the substances *in vitro*, as well as the potential effect of nanoparticles loaded with antimalarial drugs *in vivo* [39].

Ritter *et al.* (2017) developed an NDDS in which essential oil of *Achyrocline satureioides* was encapsulated in poly-ε-caprolactone (PCL) nanocapsules. The material afforded the *in vivo* protection of hepatic tissue, associated with a decrease in liver parasite load and oxidative stress in *Trypanosoma evansi* experimentally infected Wistar rats. Further studies on NDDSs associating a chemotherapeutic antiprotozoan regimen with PEs would allow novel perspectives on the treatment of *T. evansi* infection in animals as well as of related protozoan diseases in animals and humans [40].

Another important zoonotic trypanosomatid-based disease that lacks a safe, effective therapy is leishmaniasis. [41]. In response, Moreno *et al.* (2015) prepared and tested β-lapachone-loaded lecithin–chitosan nanoparticles as a topical treatment of cutaneous leishmaniasis in *Leishmania major*-infected BALB/c mice. Their results demonstrated an increase in lesion size probably associated with the downregulation of IL-1β and COX-2 gene expression without affecting parasite load. Their unique study demonstrating the use of polymeric nanoparticles with plant compounds against experimental *L. major* infection in mice would benefit from additional studies that elaborate the importance of using NDDSs against *Leishmania* spp. infections in humans [42].

Praziquantel is the drug of choice for treating schistosomiasis, whereas triclabendazole is preferred for treating fascioliasis. Although treatments to date have been effective, drug resistance has

been reported in some endemic areas [43]. To circumvent those problems, the effect of curcumin–nisin poly(lactic acid) nanoparticles was evaluated against uninfected juvenile and adult stages of *Biomphalaria pfeifferi* snails [44]. Findings revealed a potential molluscicidal effect by reducing the number of viable juvenile stages, along with a significant reduction in the egg-laying capacity of adult snails. Although interesting molluscicidal activities have been demonstrated, more studies are needed to determine the toxicity, stability, and environmental dispersion of the nanoparticles.

*Curcuma longa* L. is a plant native to Southeast Asia whose main chemical components are curcumin, bisdemetoxycurcumin, and demetoxycurcumin. The ethanolic extract of the rhizomes has amebicidal activity, while the other extracts have antibacterial activity [45]. Because curcumin possesses *in vitro* antiprotozoal activity, especially against leishmaniasis, giardiasis, and trypanosomiasis, Luz *et al.* (2012) evaluated the *in vitro* schistosomicidal activity of curcumin incorporated into poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA) nanoparticles prepared via nanoprecipitation were dissolved in acetonitrile and dropped into the stirred surfactant aqueous phase at room temperature by using a syringe. The suspension was stirred for 30 min, and the evaporation under reduced pressure was used to remove the organic solvent and concentrate the suspension. The curcumin-loaded PLGA nanoparticles of 50 and 100 μM caused the death of all worms and a separation of 50–100% of *Schistosoma mansoni* couples at concentrations starting at 30 μM. Moreover, the curcumin-loaded PLGA nanoparticles also decreased the motor activity and caused partial alterations in the tegument of adult worms [46].

Propolis is a resinous hive product produced by honeybees from various plant sources, among which Brazilian red propolis can be obtained in northeast Brazil and has been chemically characterized as containing pterocarpanes, isoflavonoids, chalcones, prenylated benzophenones, and phenylpropanoids. Since the extract of a sample of Brazilian red propolis exhibited bactericide activity [47], Nascimento *et al.* (2016) developed nanoparticles with red propolis extract by using a PCL–pluronic polymeric matrix. When the nanoparticles were evaluated for their antioxidant and leishmanicidal activity, the results showed that red propolis was a potential candidate in therapy against negligible diseases such as leishmaniasis [48].

Bitencourt *et al.* (2017) examined nanoparticles produced with 10 mg of extract of *Syzygium cumini* (L.) Skeels and prepared by emulsification and solvent evaporation using polysorbate 80, ethyl acetate, sorbitan monooleate, and PCL. When the authors evaluated the *in vivo* effect of the treatments in *Candida albicans*-infected diabetic rats, the nanoparticles presented better results than the extract for treatment against diabetes mellitus-related fungal infections [49].

*Cinnamomum zeylanicum*, commonly called cinnamon and native to Sri Lanka, is commonly used as a condiment in various cultures and in traditional medicines with antimicrobial activity [50]. The extracts of the plant demonstrated significant inhibitory effects on *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Brucella melitensis*, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter baumannii*, *Listeria monocytogenes*, and *Listeria monocytogenes*, among others, whereas its essential oil demonstrated activity against *Streptococcus pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. pneumoniae*, *K. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *S. aureus*, *Aspergillus brasiliensis*, *Candida albicans*, *Salmonella typhi*, *S. aureus*, *E. coli*, and *B. subtilis*, among others [51,52].

Santos *et al.* (2017) also prepared a nanocapsule with 5% cinnamon essential oil with the aim of evaluating nanocapsules in order to control parasitic infections caused by *Rhipicephalus microplus* in animals. The nanocapsules showed an antiparasitic effect when low concentrations were used compared to the pure essential

oil. Such work is significant for pharmacology, because the essential oil of *C. zeylanicum* has excellent antimicrobial and antifungal activity, which can be parameters for using the essential oil in the development of nanocapsules with antimicrobial activity [53].

Ivermectin is a broad-spectrum antiparasitic agent used to treat parasitic conditions in humans such as intestinal strongyloidiasis, onchocerciasis, and pediculosis capitis [54]. Gamboa *et al.* (2016) encapsulated ivermectin in nanocapsules of 50–55 nm to evaluate their antiparasitic activity in systems formed with Solutol<sup>®</sup>, Lipoïd<sup>®</sup>, Labrafac<sup>®</sup>, or Captex<sup>®</sup> 8000, NaCl, and water. Among their results, nanocapsules with an encapsulation rate greater than 90% demonstrated potential as an alternative to current methods of anthelmintic therapy [55].

Pinto *et al.* (2016) produced nanocapsules incorporated with essential oil from *Lippia sidoides* leaves with polycaprolactone, Kolliphor P 188<sup>®</sup>, and ethyl laurate. With a particle diameter of 173.6 nm, the nanocapsules demonstrated stability at 5 °C during 60 days of storage in an accelerated stability study [56]. More recently, Paula *et al.* (2017) pursued the development of nanoparticles of chitosan and Brazilian regional gums (i.e., *Anacardium occidentale*, *Sterculia striata*, and *Anadenanthera macrocarpa*) for the encapsulation of essential oil of *L. sidoides* in nanosystems varying in size from 17 nm to 800 nm, all of which demonstrated a good encapsulating efficiency of 62% on average [57].

*Matricaria recutita*, commonly known as chamomile, is a medicinal plant that contains a large number of therapeutic and active compounds, including bisabolol oxides, bisabolone oxide,  $\alpha$ -bisabolol, spathulenol, enyne-dicycloethers, and chamazulene. The medicinal plant is used in traditional medicines primarily given its neuroprotective and antimicrobial activity [58]. Ghayempour and Montazer (2017) encapsulated chamomile extract into nanocapsules using tragacanth gum 60–80 nm in size and mixed the extract with TritonX-100, almond oil, aluminum chloride 2%, and deionized water. Among their results, the nanocapsules showed antimicrobial activity against *S. aureus*, *E. coli*, and *C. albicans* [59].

Last, *Melaleuca alternifolia* is used topically for its antimicrobial and anti-inflammatory effects. The oil contains monoterpenes with bactericidal activity, and clinical studies have shown its efficacy against a range of superficial infections and oral candidiasis, as well as against the colonization of methicillin-resistant *S. aureus* carriage [60]. The nanocapsules were produced by incorporating essential oil obtained from the leaves of *M. alternifolia* with tea tree oil (0.5 g), Span 80<sup>®</sup> PCL, acetone, and Tween 80<sup>®</sup>. When the nanocapsules were used to evaluate the *in vitro* activity against *Trichophyton rubrum*, the system developed with essential oil of *M. alternifolia* showed efficiency in reducing the growth of *T. rubrum* [61].

## 2.2. Micelles

Micelles, especially polymeric micelles, are formed of polymers that impart specific characteristics and have been studied for more than a decade as potential drug-carrying nanosystems [62]. The type of intermolecular forces involved in their formation determines the classification of micelles, of which generally three types exist: amphiphilic micelles formed by hydrophobic interactions, polyion complex micelles resulting from electrostatic interactions, and micelles stemming from metal complexation [63,64].

In the first category, polymeric micelles represent a collection of amphiphilic surfactant molecules that self-assemble into shell structures with the hydrophilic block forming an outer layer—that is, molecules with two distinct regions with opposite affinity as well as hydrophilic and hydrophobic properties relative to a solvent [65].

Polymeric micelles are the most promising candidates for use in NDDS given their innate characteristics for drug targeting, including an increase in drug solubility [65], the chemical stabilization of active hydrophobic molecules for passive targeting with enhanced

permeability and retention effect [66,67], and small particle size (i.e., 10–100 nm), all of which can facilitate favorable biodistribution and high structural stability [68]. Moreover, micelles possess the additional advantage of being easily reproducible and synthesized on a large scale [69]. The choice of drugs to be encapsulated depends on micelle geometry and the hydrophobic character of the drugs encapsulated in the core [70].

A successful example of chemical drug encapsulation within pristine, lactosylated, and mixed poly(ethylene oxide)–poly(propylene oxide) polymeric micelles might be that described for the antiparasitic, antimicrobial, and immunomodulatory agent nitazoxanide. Results with nitazoxanide demonstrated that the encapsulated drug actively targeted to hepatocytes more efficiently than free drug compounds [71], which highlights new insights into the treatment of liver-associated parasitic and viral infections.

A plant compound that has attracted great interest for its applicability in human diseases is curcumin, which has shown antioxidant, anti-inflammatory, anticancer, antigrowth, antiarthritic, antiatherosclerotic, antidepressant, antiaging, antidiabetic, antimicrobial, wound-healing, and memory-enhancing activities [72]. Curcumin derives from the root of *Curcuma longa* and has long been consumed as a spice [73]. Chen *et al.* (2016) showed that lecithin-based self-assembling mixed polymeric micelles could function as an effective curcumin delivery system by enhancing curcumin's bioavailability [74]. In other work, curcumin was encapsulated in polymeric micelles composed of block copolymers of methoxy poly(ethylene glycol) and N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide modified with monolactate, dilactate, and benzoyl side groups, and all of the curcumin-loaded polymeric micelle formulations showed a significant cytotoxic effect against three cancer cell lines, thereby demonstrating promising results for cancer therapy [75].

Because many PEs present low stability and pose serious challenges for water insolubility, micelles are promising candidates for containing PEs and guiding their release within specific sites of action. One example of using micelles for PE delivery was presented with *Sesbania grandiflora* bark extract, either loaded or not in micelles of Pluronic<sup>®</sup> filled in closed, amber-color bottles and placed in stability chambers at 50, 60, 70, 80, and 90 °C for 8 h. The results indicated their better antibacterial activity and 10-times higher stability than the free extract [76].

Duarte *et al.* (2016) evaluated the *in vitro* and *in vivo* antileishmanial activity of an 8-hydroxyquinoline-containing polymeric micelle system against *Leishmania* spp. parasites. The results revealed that micelles were effective in treating both *L. infantum* and *L. amazonensis*-infected BALB/c mice, which indicates new avenues for the development of new regimens for treating leishmaniasis [77].

Also worthy of note is the adoption of polymeric micelles as nanoscaled systems for PE delivery, which, though not fully explored, presents an interesting novelty in therapy for parasitic diseases.

## 2.3. Nano- and Microemulsions

Nanoemulsions and microemulsions are submicron-sized emulsions for systemic delivery formed by immiscible liquids and stabilized by using an appropriate surfactant. Also termed biphasic oil in water (O/W) or water in oil (W/O) and multiphasic water in oil in water (W/O/W). Nanoemulsions and microemulsions differ depending on the range of particle sizes and their stability; microemulsions are approximately 10–100 nm and have thermodynamic stability, whereas nanoemulsions are 100–500 nm and are kinetically stable. Depending on the surfactant chosen, as well as the ratios of surfactant-to-cosurfactant mixtures and the concentrations in which they are used, the final emulsion formulation might present some side effects. Nevertheless, those systems have some advantages compared to other drug delivery systems, including increased drug load-

ing into the particles, drug solubility and bioavailability, and drug protection from enzymatic degradation. For those reasons, such NDDSs present great potential to deliver PEs as a strategy for controlling different diseases, including bacterial and parasitic infections [23,78].

Data from the literature have indicated better results when compounds are incorporated into nano- and microemulsions, and recent findings underscore the usefulness of those NDDS for plant-derived compounds. Campana *et al.* (2017) formulated three microemulsions in the range of 400–500 nm with essential oil of *Cinnamomum cassia* and *Salvia officinalis*. Among their results, the microemulsions promoted an outstanding reduction in *S. aureus* biofilms after 90 min of exposure, which could be important for disinfecting contaminated surfaces [79]. In other work, researchers prepared a topical microemulsion containing extracts of *Quercus infectoria* to be used against *S. aureus*, *P. aeruginosa*, and *C. albicans*. The microemulsion developed using oil (i.e., Captex 200), surfactant (i.e., Tween 80®), cosurfactant (i.e., PEG 600), distilled water, and extracts in different ratios showed interesting results with agar diffusion [80].

The oil of *Azadirachta indica* was used to develop an oil-in-water microemulsion with acaricidal activity. *In vitro* testing demonstrated the lethal time of 10% v/v neem oil microemulsion of 192.5 min against larvae of *Sarcoptes scabiei* var. *cuniculi*. The microemulsion was obtained with neem oil, an emulsifier system, and water in a weight ratio of 1:3.5:5.5. The mixture of Tween 80® and sodium dodecyl benzene sulfonate in a 4:1 ratio by weight was used as compound surfactant, and the mixture of the compound surfactant and hexyl alcohol (4:1, by weight) was used as an emulsifier system [81].

Another potential application of that NDDS was proposed by Pant *et al.* (2014) when developing a pesticide delivery system. The aqueous filtrates of *Pongamia glabra* and *Jatropha curcas* were used to prepare the nanoemulsion to increase the activity of essential oil of *Eucalyptus globulus* *Tribolium castaneum* [82]. The authors observed greater activity with the nanoemulsion containing aqueous filtrate than that with filtrates alone, and the best result surfaced with the use of small nanoemulsion particles. Another study involving the essential oil of *E. globulus* was conducted by Moustafa *et al.* (2015), who tested the nanoemulsion against larvae of *Pectinophora gossypiella* (Saund.) and *Earias insulana* (Boisd.). The system produced with a mean droplet size of 8.003 nm showed exceptional activity in controlling cotton bollworms [83].

In other work, nanoemulsion O/W containing apolar fraction from *Manilkara subsericea* fruits was developed. The formulation, 155.2 ± 3.8 nm in size, obtained with 5% (w/w) of octyldodecyl myristate oil, 5% (w/w) of surfactants (i.e., sorbitan monooleate and polysorbate 80), 85% (w/w) of water, and 5% (w/w) of apolar fraction showed better activity against cotton pest *Dysdercus peruvianus* than did the hexane-soluble fraction from ethanolic crude extract or triterpenes alone [84].

Considering all the potential of nano- and microemulsions as drug delivery systems, those formulations should be better developed in order to control infections and parasite growth on the surfaces of medical materials as well as to enhance various agricultural applications.

#### 2.4. Liquid Crystals

LCs combine the mechanical properties of solids (i.e., structural order, rigidity, and defined bonds) and liquid-state materials (i.e., mobility and disordered as well as liquid regions) in a unique material. That circumstance results in several advantages for developing manufactured products containing herbal extracts for the pharmaceutical and cosmetic sectors mainly due to their greater stability, better variation in the release profile, increased the solubility of the

substances, and protection from photo- and thermal degradation than conventional emulsions [30,85,86].

LCs can be utilized as mucoadhesive systems—that is, systems capable of prolonging the duration of contact between active substances and sites of action—to allow more effective antimicrobial treatments [87–89]. Ramos *et al.* (2015), for example, reported using the methanolic extract of scapes of *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland loaded in LCs with the aim to improve the therapeutic efficacy against *Candida krusei*-associated vulvovaginal candidiasis (VVC). The results demonstrated a hexagonal liquid crystalline mesophase with higher mucoadhesive force (~12 MN) in pig vaginal mucosa. Furthermore, the *in vitro* test revealed that PE-loaded LCs increased the antifungal activity against *C. krusei* compared to the extract alone. Last, an *in vivo* prophylaxis assay of VVC suggested that groups receiving PE-loaded LCs were protected against the infectious stage [88].

In other work, an LC incorporated with methanolic extract of scapes of *S. nitens* presented interesting results against *C. albicans* resistant to azoles drugs [90]. The *in vivo* results showed a reduction in the total time necessary for animal healing; animals treated with PE-loaded LCs spent 2 days healing, whereas animals treated with tetracycline plus amphotericin B needed at least 8 days to control *C. albicans* infection. LCs loaded with different extracts thus demonstrated an alternative treatment for VVC by increasing the effectiveness of the treatment and overcoming the resistance of *Candida* spp. to conventional antifungal drugs [88,90].

However, conflicting results were observed by Choi *et al.* (2015), who incorporated 5% (w/w) Taglisodog-eum extract into lamellar LCs prepared from a mixture of ceramide 3, stearic acid, cholesterol, cetearyl alcohol, squalene, middle chain triglyceride, glyceryl monostearate, glyceryl monostearate, water, and glycerin. When *in vitro* antimicrobial activity against *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, and *C. albicans* was investigated, the results revealed antimicrobial activity against *E. coli* only. The authors suggested that another drug could be incorporated into those LCs to improve their activity [91].

Another interesting approach for effective therapy might be the development of LCs using natural oils, since they have pharmacological activities that can improve the efficacy of treatment by synergistic effects. As cases in point, several studies using andiroba, apricot, avocado, Brazil nut, buriti, cupuaçu, marigold, passion fruit, pequi, and annatto oils loaded in LCs have been conducted [92–94]. Although with promising results, such research needs to involve *in vitro* and *in vivo* assays of biocompatibility and antimicrobial activity before determining the potential of those LCs to benefit health professionals and consumers.

#### 2.5. Nanofibers

The study and development of polymeric nanofibers for medical applications have increased in recent years due to the increasing variety of spinning techniques, including electrospinning, solution blow spinning, centrifugal jet spinning, and electrohydrodynamic direct writing. Each of these techniques has many advantages and disadvantages, which explains the variability of the method of synthesis chosen for selected applications. Consequently, a wide range of natural or synthetic polymers continue to be used to synthesize nanofibers [95]. At the same time, several biocompatible polymers can be used and, after processing, may present as fine acicular nanosized rods with diameters ranging from 5 to 90 nm [96,97]. That process is interesting for the manufacturing of transdermal systems for the treatment of wounds. Properties of thickness, external shape, number, and size of pores standardized with morphological similarity to the natural extracellular matrix in the skin, however, would enhance the healing process [98].

With such knowledge, Suganya *et al.* (2011) developed PCL–polyvinyl pyrrolidone (PVP) nanofibers incorporated with extracts



of *Tecomella undulata* (7.5% w/w) for wound healing. *In vitro* drug release showed that, after 24 h, 40.9% of the extracts was released. *In vitro* assays against the most common pathogenic bacteria in wound infections (i.e., *P. aeruginosa*, *S. aureus*, and *E. coli*) showed great antibacterial activity [99]. Later, Charernsriwilaiwat et al. (2013) incorporated *Garcinia mangostana* extracts into chitosan-based nanofibers with the aim of accelerating wound healing. *In vitro* release assays demonstrated that a PE release rate of 80% in 60 min. Antibacterial experiments against *S. aureus* and *E. coli* showed that lower values for bacterial growth inhibition were obtained by PE-incorporated nanofibers (3% w/w, 0.5 mg/ml) than with pure PEs (5 mg/mL). Chitosan nanofibers interacted with the membrane of the bacteria to alter cell permeability, which increased the effectiveness of treatment [100]. More recently, Bonan et al. (2015) demonstrated that nanofibers made from polylactic acid-PVP blends containing 20% (wt%) *Copaifera* sp. oil had greater antimicrobial action against *S. aureus* when increased quantities of PVP were used [101]. However, a notable lack of studies testing the potential of PE-loaded nanofibers against parasites remains, which highlights a fertile field to be explored by researchers in the future.

## 2.6. Liposome

Liposomes are microscopic vesicles composed of one or more concentric lipid bilayers containing internal aqueous space that allow the encapsulation of hydrophilic and lipophilic substances as well as protect active principles from direct interactions with the constituents of the biological environment [102,103]. Liposomes can be developed with one or more membranes and can thus be classified as unilamellar or multilamellar, with particle sizes ranging from 20 nm to 5,000 nm [104].

In recent years, research conducted to develop liposomes composed of plant species with different pharmacological activities has expanded. To evaluate the potential anti-*Leishmania* activity, a liposomal formulation of *Curcuma longa* was developed. Liposomes were obtained by evaporating the solvent and incorporating 5.0 mg of hexane fractions from *C. longa* extract, 20 mg of phosphatidylcholine, 2.6 mg of cholesterol, and 0.3 mg of Tween 20<sup>®</sup>, all dissolved in 10 mL of chloroform. *In vitro* assays exhibited the greater inhibition of the promastigote forms for *C. longa* extract loaded in liposome (5.5 µg/mL<sup>-1</sup> (IC<sub>50</sub>/48 h = 2.9 µg/mL<sup>-1</sup>) than the free fraction (125 µg/mL). The authors argued that the liposome improved the solubility and permeability of the PE, which contributed to the improvement in the biological activity [105]. Another study evaluating *C. longa* extract-loaded liposomes demonstrated reduced infection with an increased survival rate of animals infected with *Plasmodium berghei*. The preparation of the liposomes was performed by modifying the film hydration technique and using a chloroform:methanol (2:1) mixture as the solvent. A range of molar ratios of curcuminoids to lipids (i.e., 1:5, 1:7.5, and 1:10) were tested. Liposomes were freeze-dried to avoid curcuminoid degradation, and the average size of all formulations remained within the range for intravenous administration (<250 nm) [106].

Barros et al. (2013) developed a liposome containing a triterpene isolated from *Combretum leprosum*, previously described as a leishmanicidal agent against *L. amazonensis* promastigotes (Teles et al., 2011). Liposomal systems were obtained through a film-forming technique using 2.0 mg of triterpene (lupane) added to the lipid solution, while the solvent used was a 1:1 mixture of chloroform and methanol. The liposomes formed had a mean size of 146.3 ± 0.27 nm. *In vitro*, the number of parasites in murine macrophages showed a 61.7% decrease after 72 h when incubated with 6.0 µg/mL of liposomal-lupane [107].

To increase the solubility and permeability of *Orthosiphon stamineus* in the nervous system, Aisha et al. (2014) developed liposomes with *O. stamineus* extract and soya phospholipids, which were dissolved in chloroform, while the *O. stamineus* extract was dissolved in ethanol or methanol, followed by the evaporation of

the solvent. The liposomes formed had a dynamic diameter of 153–177 nm and demonstrated a significant increase in the intestinal absorption of active principles, which can be attributed to their improved aqueous solubility and permeability [108].

Chorachoo et al. (2013) developed new liposomal formulations encapsulated with a *Rhodomyrtus tomentosa* isolate. Liposomes were prepared by modified ethanol injection, and rhodomyrtone was dissolved in absolute ethanol to obtain a concentration of 100 mg/mL<sup>-1</sup> for the preparation of the formulation. The liposomes formed had diameters of 209–459 nm, depending on the amount of lipid phase used. The minimal bactericidal concentration values of liposomes against 11 clinical strains and reference strains (i.e., *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, and *Staphylococcus epidermidis*) ranged from 1 to 4 and from 4 to 64 µg/mL<sup>-1</sup>, respectively. The liposome formulation was more effective than azelaic acid, benzoyl peroxide, and clindamycin against *S. aureus* ATCC 25923 and *S. epidermidis* ATCC 35984 [109].

Earlier, Gortzi et al. (2008) developed liposomes encapsulated with *Myrtus communis* extract and determined the antioxidant and antimicrobial activity of the species both before and after encapsulation. The formulations were developed by the film-forming technique, with a mixture of chloroform and methanol in a 3:1 ratio as the solvent and an extract of *M. communis* in a concentration of 1.5 mg/mL<sup>-1</sup>. The diameters of the liposomes obtained ranged from 230 to 270 nm, and the extract presented antioxidant and antimicrobial activity. At concentrations up to 160 ppm, the extract also showed activity superior to the  $\alpha$ -tocopherol control. When the extract was encapsulated in liposomes, its antioxidant, as well as its antimicrobial activity, proved to be superior to the pure form of *M. communis* [110].

## 3. FINAL CONSIDERATIONS

Using PEs as a therapeutic option to treat inflammation, auto-immune disorder, and infections, including parasitic diseases, has been consolidated in many cultures worldwide [111,112]. The safety, efficacy, and potential adverse side effects associated with using PEs are also known [113–115]. For those reasons, our aim in preparing this review was to shed light on the application of NDDSs for PE delivery applied to infectious diseases. Such systems should be regarded as innovative therapeutic options due to their versatility in terms of tissue or organ targeting and controlled drug release. Key elements that point to the necessity for developing NDDSs specifically for PE delivery are numerous:

1. NDDSs can facilitate the dispersal and blood distribution of PEs in oral and topical formulations.
2. The adoption of controlled release systems can overcome pharmacokinetic instability observed in the blood levels of a drug-extract after its intravenous administration by reducing fluctuation in circulating drug levels.
3. It is possible to induce a tissue-specific targeting of NDDSs for local drug delivery, which might decrease drug levels in the blood as well as the necessity of multiple dosages in some cases.
4. Many PEs exhibit some instability when in contact with human body fluids. Such NDDSs could be excellent options for protecting PE constituents until their delivery to the target.
5. Many plant compounds present low hydrophilicity that can impair their distribution and delivery within the human body. By contrast, other compounds cannot cross cellular barriers and membranes due to their elevated hydrophilicity. Those NDDSs could overcome problems related to water solubility faced by PE compounds.
6. Depending on the solvent/method used for extract preparation, residual compounds might present a cytotoxic effect on human cells, which could be reversed by encapsulating the extract in a biocompatible system.

**Table 1. Plant extracts loaded in nanostructured drug delivery systems and their application against parasitic and antimicrobial diseases.**

Extract name or phyto-constituent	Encapsulation method	Application	Properties	Reference
Artemether, derivative of artemisinin	Chitosan–lecithin nanoparticles	<i>Plasmodium berghei</i>	Increased <i>in vivo</i> antimalarial activity with decreased parasitemia	Chadha <i>et al.</i> (2012)
<i>Achyrocline satureioides</i>	Poly- $\epsilon$ -caprolactone nanocapsules	<i>Trypanosoma evansi</i>	Cytoprotection of the hepatic tissue of infected rats	Ritter <i>et al.</i> (2017)
$\beta$ -lapachone, Lapacho tree	Lecithin–chitosan nanoparticles	<i>Leishmania major</i>	Induced protective anti-inflammatory activity on the lesion tissues of infected mice	Moreno <i>et al.</i> (2015)
Curcumin	Curcumin-nisin poly(lactic acid) nanoparticles	<i>Biomphalaria pfeifferi</i>	Molluscicidal activities on different developmental stages of animals	Omobhude <i>et al.</i> (2017)
	Poly(lactic-co-glycolic) acid nanoparticles	<i>Schistosoma mansoni</i>	Decreased motor activity and partial alterations in the tegument of adult worms	Luz <i>et al.</i> (2011)
Red propolis	Poly- $\epsilon$ -caprolactone–pluronic polymeric matrix	<i>Leishmania braziliensis</i>	Enhanced antiparasitic activity on <i>Leishmania</i> promastigotes <i>in vitro</i>	Nascimento <i>et al.</i> (2016)
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Nanoemulsions and polymeric nanocapsules	<i>Alphitobius diaperinus</i>	NDDS decreased toxic effect of crude essential oil	Volpato <i>et al.</i> (2016)
	Nanoemulsions and polymeric nanocapsules	<i>Rhipicephalus microplus</i>	Enhanced antiparasitic effects compared to pure essential oils	Santos <i>et al.</i> (2017)
Curcuminoids ( <i>Curcuma longa</i> L.)	Lipid nanoparticles	<i>Plasmodium berghei</i>	Increased lifespan of infected mice	Nayak <i>et al.</i> (2010)
<i>Eucalyptus citriodora</i>	Chitosan nanoparticles	Gastrointestinal nematodes	Decreased acute cytotoxicity in mice compared to free oils Antinematode activity in infected sheep similar to free oils	Ribeiro <i>et al.</i> (2014)
8-hydroxyquinoline	Polymeric micelles	<i>Leishmania</i> spp. parasites	Effectiveness in treating <i>Leishmania infantum</i> -infected BALB/c mice Hepatic and renal protection	Duarte <i>et al.</i> (2016)
Curcumin	Nanoemulsion	<i>Toxoplasma gondii</i>	Enhanced effect of pure curcumin in treating acute and chronic experimental toxoplasmosis	Azami <i>et al.</i> (2018)
Coumarin-rich <i>Pterocaulon balansae</i>	Nanoemulsion	<i>Acanthamoeba keratitis</i>	Effect against trophozoites comparable to current drugs	Panatieri <i>et al.</i> (2016)
<i>Pterodon pubescens</i> (Benth.) Fruit extracts	Nanoemulsion	<i>Leishmania amazonensis</i> promastigotes and amastigotes	Improved selectivity index and improved activity against parasites	da Silva Santos <i>et al.</i> (2016)
<i>Copaifera paupera</i> oleoresins	Nanoemulsion	<i>Leishmania amazonensis</i> and <i>Leishmania infantum</i>	Increased plant activity against both species	Rodrigues <i>et al.</i> (2018)
<i>Curcuma longa</i>	Liposomes	<i>Leishmania amazonensis</i>	Important morphological changes and plasma membrane alterations after treatment with subinhibitory concentrations	Amaral <i>et al.</i> (2014)
<i>Curcuma longa</i>	Liposomes	<i>Plasmodium berghei</i>	Decreased parasitemia and elevated survival rate of animals	Aditya <i>et al.</i> (2012)
<i>Combretum leprosum</i>	Liposomes	<i>Leishmania amazonensis</i>	Significant <i>in vitro</i> reduction of intracellular parasitism in macrophages with increased protective immune response Reduction in lesion size and amastigote:macrophage ratio in infected tissue <i>in vivo</i>	Barros <i>et al.</i> (2013)

Table 1 summarizes PEs loaded in NDDSs and their applications against parasitic and antimicrobial diseases.

The association of PEs and NDDSs has shown satisfactory results in the context of improving biopharmaceutical properties. Regardless of the NDDS used, results of enhanced antimicrobial activity and decreased cytotoxicity compared to free active are promising. The features of NDDSs for the treatment of infections can contribute to the development of new drugs that can bypass the serious problem of microbial resistance. For that reason, advances remain necessary to fully characterize the plant-based assets used, the systems in which they should be inserted, and their effectiveness, all to identify viable therapies to treat the mentioned diseases [116–119].

Soares *et al.* (2016) also reviewed clinical trials involving PEs with anti-inflammatory activity. However, we excluded their article from our review because it did not address parasitic or antimicrobial diseases [120].

In addition, preclinical studies with cervical human papillomavirus-positive women without high-grade cervical neoplasia ( $N = 287$ ) were conducted by Basu *et al.* (2013) using curcumin and curcumin containing polyherbal preparations in order to evaluate the antimicrobial and antiviral properties of those substances. Their results showed curcumin's effectiveness and safety in clearing established HPV infection, as well as a better rate of clearance (81.3%) than the placebo [121].

Knowing that PEs exhibit excellent microbial activities and that the *in vitro* results of their association with NDDSs are better than the administration of them alone, as well as given the prospects of developing conventional medicines of natural products, we propose that nanotechnology should be directly involved in the process of obtaining new formulations. To that end, however, investments are necessary in the field in order to advance *in vivo* studies for the future benefit of health professionals and consumers.

## CONCLUSION

In this review, we have summarized several papers on PEs loaded in NDDSs that represent alternatives to current therapies used to treat parasitic and antimicrobial diseases. The *in vitro* and *in vivo* studies evidenced that the association of PEs and NDDSs has shown satisfactory results in improving the biopharmaceutical properties of PEs. Regardless of the NDDS used, the results revealed enhanced antimicrobial activity and decreased cytotoxicity compared to PEs free. Despite those advantages, such approaches with PEs are surprisingly few in the literature and often examined for their cosmetic applications. Accordingly, although promising, the results of the studies reviewed herein need to be elaborated upon via *in vivo* assays (i.e., phase I) to benefit health professionals and consumers.

## CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

## FUNDING

None.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

## REFERENCES

- [1] Copeland NK, Aronson NE. Leishmaniasis: treatment updates and clinical practice guidelines review. *Curr Opin Infect Dis* 2015; 28(5): 426-37. [http://dx.doi.org/10.1097/QCO.000000000000194] [PMID: 26312442]
- [2] Tagliabue A, Rappuoli R. Changing Priorities in Vaccinology: Antibiotic Resistance Moving to the Top. *Front Immunol* 2018; 9: 1068. [http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2018.01068] [PMID: 29910799]
- [3] Laxminarayan R, Matsoso P, Pant S, *et al.* Access to effective antimicrobials: a worldwide challenge. *Lancet* 2016; 387(10014): 168-75. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00474-2] [PMID: 26603918]
- [4] Carr AL, Daley MJ, Givens Merkel K, Rose DT. Clinical Utility of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Nasal Screening for Antimicrobial Stewardship: A Review of Current Literature. *Pharmacotherapy* 2018; 38(12): 1216-28. [http://dx.doi.org/10.1002/phar.2188] [PMID: 30300441]
- [5] Ferket PR. Alternatives to antibiotics in poultry production: responses, practical experience and recommendations. In: Lyons TP, Jacques KA, Eds. *Proceedings of Alltech's 20th Annual Symposium*. UK. Nottingham: University Press 2004; pp. 57-67.
- [6] Ku TSN, Walraven CJ, Lee SA. *Candida auris*: Disinfectants and Implications for Infection Control. *Front Microbiol* 2018; 9: 726. [http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.00726] [PMID: 29706945]
- [7] Vanaerschot M, Huijben S, Van den Broeck F, Dujardin JC. Drug resistance in vectorborne parasites: multiple actors and scenarios for an evolutionary arms race. *FEMS Microbiol Rev* 2014; 38(1): 41-55. [http://dx.doi.org/10.1111/1574-6976.12032] [PMID: 23815683]
- [8] Costa CSR, Costa AEIS, Santos AMM, Pereira JW, Carvalho RRC, Carvalho-Filho JLS. Current Status of the Occurrence and Reaction Root-knot Nematodes in the Main Botanical Families of Medicinal Plants. *Journal of Experimental Agriculture International* 2019; 32: 1-21.
- [9] Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod* 2012; 75(3): 311-35. [http://dx.doi.org/10.1021/np200906s] [PMID: 22316239]
- [10] Almeida L, Oshiro Júnior JA, Silva M, *et al.* Tablet of *Ximena Americana* L. Developed from Mucoadhesive Polymers for Future Use in Oral Treatment of Fungal Infections. *Polymers (Basel)* 2019; 11(2): 1-21. [http://dx.doi.org/10.3390/polym11020379] [PMID: 30960363]
- [11] Bilia AR, Isacchi B, Righeschi C, Guccione C, Bergonzi MC. Flavonoids Loaded in Nanocarriers: No Opportunity to Increase Oral Bioavailability and Bioefficacy. *Food Nutr Sci* 2014; 5: 1212-27. [http://dx.doi.org/10.4236/fns.2014.513132]
- [12] Bento da Silva P, Fioramonti Calixto GM, Oshiro Júnior JA, *et al.* Structural Features and the Anti-Inflammatory Effect of Green Tea Extract-Loaded Liquid Crystalline Systems Intended for Skin Delivery. *Polymers (Basel)* 2017; 9(1): 1-15. [http://dx.doi.org/10.3390/polym9010030] [PMID: 30970708]
- [13] Sato MR, Oshiro Junior JA, Machado RT, *et al.* Nanostructured lipid carriers for incorporation of copper(II) complexes to be used against *Mycobacterium tuberculosis*. *Drug Des Devel Ther* 2017; 11: 909-21. [http://dx.doi.org/10.2147/DDDT.S127048] [PMID: 28356717]
- [14] Tung WL, Hu SH, Liu DM. Synthesis of nanocarriers with remote magnetic drug release control and enhanced drug delivery for intracellular targeting of cancer cells. *Acta Biomater* 2011; 7(7): 2873-82. [http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2011.03.021] [PMID: 21439410]
- [15] Oshiro JA, Scardueli CR, José G, *et al.* Development of ureasil-polyether membranes for guided bone regeneration. *Biomed Phys Eng Express* 2017; 3: 1-7. [http://dx.doi.org/10.1088/2057-1976/aa56a6]
- [16] Zorzia GK, Carvalho ELS, Posera GLV, Teixeira HF. On the use of nanotechnology-based strategies for association of complex matrices from plant extracts. *Rev Bras Farmacogn* 2015; 25: 426-36. [http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2015.07.015]

- [17] Sangeetha G, Rajeshwari S, Venkatesh R. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles by aloe barbadensis miller leaf extract: structure and optical properties. *Mater Res Bull* 2011; 46: 2560-6. [http://dx.doi.org/10.1016/j.materresbull.2011.07.046]
- [18] Thema JFT, Manikandan E, Dhlamini MS, Maaza M. Green synthesis of ZnO nanoparticles via *Agathosma betulina* natural extract. *Mater Lett* 2015; 161: 124-7. [http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2015.08.052]
- [19] Khan MM, Harunsani MH, Adedeji AR. Plant-Assisted Fabrication of SnO<sub>2</sub> and SnO<sub>2</sub>-Based Nanostructures for Various Applications. *Nanomaterials and Plant Potential* 2019; pp. 285-97. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-05569-1\_11]
- [20] Escárcega-González CE, Garza-Cervantes JA, Vázquez-Rodríguez A, *et al.* In vivo antimicrobial activity of silver nanoparticles produced via a green chemistry synthesis using *Acacia rigidula* as a reducing and capping agent. *Int J Nanomedicine* 2018; 13: 2349-63. [http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S160605] [PMID: 29713166]
- [21] Ahmed M, Douek M. The role of magnetic nanoparticles in the localization and treatment of breast cancer. *Biomed Res Int* 2013; 2013 [http://dx.doi.org/10.1155/2013/281230]
- [22] Bonifácio BV, Silva PB, Ramos MA, Negri KM, Bauab TM, Chorilli M. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. *Int J Nanomedicine* 2014; 9: 1-15. [PMID: 24363556]
- [23] Soppimath KSK, Aminabhavi TMTM, Kulkarni ARAR, Rudzinski WE. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release* 2001; 70(1-2): 1-20. [Internet]. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00339-4] [PMID: 11166403]
- [24] Schaffazick SR, Pohlmann AR, Dalla-Costa T, Guterres SS. Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. *Eur J Pharm Biopharm* 2003; 56(3): 501-5. [http://dx.doi.org/10.1016/S0939-6411(03)00139-5] [PMID: 14602195]
- [25] Crini G, Fourmentin S, Fenyvesi É, Torri G, Fourmentin M, Morin N. Cyclodextrins, from molecules to applications *Environ Chem Lett*. Springer International Publishing 2018. Internet ScienceDirect [Internet]. [cited 2019 April 19]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/search/advanced?qs=plant%20extra ct%20and%20nanosystems&show=25&sortBy=relevance&years=2018&lastSelectedFacet=years>
- [27] Karimi N, Ghanbarzadeh B, Hamishehkar H, Mehrmuz B, Kafil HS. Antioxidant, antimicrobial and physicochemical properties of turmeric extract-loaded nanostructured lipid carrier (NLC). *Colloid and Interface Sci Communications* 2018; 22: 18-24. [http://dx.doi.org/10.1016/j.colcom.2017.11.006]
- [28] Oshiro JA Junior, Mortari GR, de Freitas RM, Marcantonio-Junior E, Lopes L, Spolidorio LC, *et al.* Assessment of biocompatibility of ureasil-polyether hybrid membranes for future use in implantodontology. *Int J Polym Mater Polym Biomater* 2016; p. 65.
- [29] Hughes GA. Nanostructure-mediated drug delivery. *Nanomedicine* 2005; 1(1): 22-30. [http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2004.11.009] [PMID: 17292054]
- [30] Yhirayha C, Soontaranon S, Wittaya-Areekul S, Pitaksuteepong T. Formulation of lyotropic liquid crystal containing mulberry stem extract: influences of formulation ingredients on the formation and the nanostructure. *Int J Cosmet Sci* 2014; 36(3): 213-20. [http://dx.doi.org/10.1111/ics.12116] [PMID: 24471700]
- [31] Moraes ARU, Development CAP. *Cosmetics* 2018; 5: 1-7.
- [32] Wagner AM, Spencer DS, Peppas NA. Advanced architectures in the design of responsive polymers for cancer nanomedicine. *J Appl Polym Sci* 2018; 135(24): 1-2. [http://dx.doi.org/10.1002/app.46154] [PMID: 30174339]
- [33] Rafiei P, Haddadi A. Pharmacokinetic Consequences of PLGA Nanoparticles in Docetaxel Drug Delivery. *Pharm Nanotechnol* 2017; 5(1): 3-23. [http://dx.doi.org/10.2174/2211738505666161230110108] [PMID: 28948907]
- [34] Shang L, Nienhaus K, Nienhaus GU. Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. *J Nanobiotechnology* 2014; 12: 5. [http://dx.doi.org/10.1186/1477-3155-12-5] [PMID: 24491160]
- [35] Khadka P, Ro J, Kim H, Kim I, Kim JT, Kim H, *et al.* Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability. *Asian J Pharm Sci* 2014; 9: 304-16. [http://dx.doi.org/10.1016/j.ajps.2014.05.005]
- [36] Rajendran R, Radhai R, Kotresh TM, Csiszar E. Development of antimicrobial cotton fabrics using herb loaded nanoparticles. *Carbohydr Polym [Internet] Elsevier Ltd* 2013; 91: 613-7. [http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.064]
- [37] Cui L, Mharakurwa S, Ndiaye D, Rathod PK, Rosenthal PJ. Antimalarial drug resistance: Literature review and activities and findings of the ICEMR network. *Am J Trop Med Hyg* 2015; 93(3)(Suppl.): 57-68. [http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.15-0007] [PMID: 26259943]
- [38] Eltayeb SE, Su Z, Shi Y, Li S, Xiao Y, Ping Q. Preparation and optimization of transferrin-modified-artemether lipid nanospheres based on the orthogonal design of emulsion formulation and physically electrostatic adsorption. *Int J Pharm* 2013; 452(1-2): 321-32. [http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.05.019] [PMID: 23694805]
- [39] Chadha R, Gupta S, Pathak N. Artesunate-loaded chitosan/lecithin nanoparticles: Preparation, characterization, and in vivo studies. 2012; 38: 6-10.
- [40] Ritter CS, Baldissera MD, Grando TH, *et al.* Achyrocline satureioides essential oil-loaded in nanocapsules reduces cytotoxic damage in liver of rats infected by *Trypanosoma evansi*. *Microb Pathog* 2017; 103: 149-54. [http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2016.12.023] [PMID: 28027942]
- [41] Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 2007; 7(9): 581-96. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70209-8] [PMID: 17714672]
- [42] Moreno E, Schwartz J, Larrea E, *et al.* Assessment of  $\beta$ -lapachone loaded in lecithin-chitosan nanoparticles for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis in L. major infected BALB/c mice. *Nanomedicine (Lond)* 2015; 11(8): 2003-12. [http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2015.07.011] [PMID: 26282379]
- [43] Fallon PG, Doenhoff MJ. Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 51(1): 83-8. [http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.1994.51.83] [PMID: 8059919]
- [44] Omobhude ME, Morenikeji OA, Oyeyemi OT. Molluscicidal activities of curcumin-nisin poly(lactic acid) nanoparticle on *Biomphalaria pfeifferi*. *PLoS Negl Trop Dis* 2017; 11(8): e0005855 [http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0005855] [PMID: 28832617]
- [45] Saleheen D, Ali SA, Ashfaq K, Siddiqui AA, Agha A, Yasinza MM. Latent activity of curcumin against leishmaniasis in vitro. *Biol Pharm Bull* 2002; 25(3): 386-9. [http://dx.doi.org/10.1248/bpb.25.386] [PMID: 11913540]
- [46] Luz PP, Magalhães LG, Pereira AC, Cunha WR, Rodrigues V, Andrade E Silva ML. Curcumin-loaded into PLGA nanoparticles: preparation and in vitro schistosomicidal activity. *Parasitol Res* 2012; 110(2): 593-8. [http://dx.doi.org/10.1007/s00436-011-2527-9] [PMID: 21739309]
- [47] Righi AA, Alves TR, Negri G, Marques LM, Breyer H, Salatino A. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. *J Sci Food Agric* 2011; 91(13): 2363-70. [http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.4468] [PMID: 21590778]
- [48] do Nascimento TG, da Silva PF, Azevedo LF, *et al.* Polymeric Nanoparticles of Brazilian Red Propolis Extract: Preparation, Characterization, Antioxidant and Leishmanicidal Activity. *Nanoscale Res Lett* 2016; 11(1): 301. [http://dx.doi.org/10.1186/s11671-016-1517-3] [PMID: 27316742]
- [49] Bitencourt PER, Cargnelutti LO, Stein CS, *et al.* Nanoparticle formulation increases *Syzygium cumini* antioxidant activity in *Candida albicans*-infected diabetic rats. *Pharm Biol* 2017; 55(1): 1082-8. [http://dx.doi.org/10.1080/13880209.2017.1283338] [PMID: 28193098]
- [50] Asghar A. Elucidating the therapeutic potential of nutraceuticals A2 - Grumezescu, Alexandru Mihai BT - Nutraceuticals. *Nanotechnol Agri-Food Ind [Internet]* 2016; 23:1-70.
- [51] Ranasinghe P, Pigera S, Premakumara GA, Galappaththy P, Constantine GR, Katulanda P. Medicinal properties of 'true' cin-



- namon (*Cinnamomum zeylanicum*): a systematic review. *BMC Complement Altern Med* 2013; 13: 275. [http://dx.doi.org/10.1186/1472-6882-13-275] [PMID: 24148965]
- [52] Volpato A, Baretta D, Zortea T, Campigotto G, Galli GM, Glombowsky P, *et al.* Larvicidal and insecticidal effect of *Cinnamomum zeylanicum* oil (pure and nanostructured) against mealworm (*Alphitobius diaperinus*) and its possible environmental effects. *J Asia Pac Entomol* [Internet]. Korean Society of Applied Entomology, Taiwan Entomological Society and Malaysian Plant Protection Society.; 2016;19:1159–65. In: [http://dx.doi.org/10.1007/s10493-017-0171-5] [PMID: 28852887]
- [53] Dos Santos DS, Boito JP, Santos RCV, *et al.* Nanostructured cinnamon oil has the potential to control *Rhipicephalus microplus* ticks on cattle. *Exp Appl Acarol* 2017; 73(1): 129-38. [http://dx.doi.org/10.1007/s10493-017-0171-5] [PMID: 28852887]
- [54] González P, González FA, Ueno K. Ivermectin in human medicine, an overview of the current status of its clinical applications. *Curr Pharm Biotechnol* 2012; 13(6): 1103-9. [Internet]. [http://dx.doi.org/10.2174/138920112800399248] [PMID: 22039800]
- [55] Gamboa GVV, Palma SD, Lifschitz A, *et al.* Ivermectin-loaded lipid nanocapsules: toward the development of a new antiparasitic delivery system for veterinary applications. *Parasitol Res* 2016; 115(5): 1945-53. [http://dx.doi.org/10.1007/s00436-016-4937-1] [PMID: 26852126]
- [56] Pinto N de OF, Rodrigues THS, Pereira R de CA. Production and physico-chemical characterization of nanocapsules of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Ind Crops Prod. Elsevier BV* 2016; 86: 279-88. [Internet].
- [57] Paula HCB, Oliveira EF, Carneiro MJM, de Paula RCM. Matrix Effect on the Spray Drying Nanoencapsulation of *Lippia sidoides* Essential Oil in Chitosan-Native Gum Blends. *Planta Med* 2017; 83(5): 392-7. [PMID: 27224269]
- [58] Kazemi M. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Matricaria recutita* 2015.
- [59] Ghayempour S, Montazer M. Tragacanth nanocapsules containing Chamomile extract prepared through sono-assisted W/O/W microemulsion and UV cured on cotton fabric. *Carbohydr Polym* 2017; 170: 234-40. [http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.04.088] [PMID: 28521992]
- [60] Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oil and the major monoterpene component terpinen-4-ol on the development of single- and multistep antibiotic resistance and antimicrobial susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56(2): 909-15. [http://dx.doi.org/10.1128/AAC.05741-11] [PMID: 22083482]
- [61] Flores FC, de Lima JA, Ribeiro RF, *et al.* Antifungal activity of nanocapsule suspensions containing tea tree oil on the growth of *Trichophyton rubrum*. *Mycopathologia* 2013; 175(3-4): 281-6. [http://dx.doi.org/10.1007/s11046-013-9622-7] [PMID: 23392821]
- [62] Tanbour R, Martins AM, Pitt WG, Husseini GA. Drug Delivery Systems Based on Polymeric Micelles and Ultrasound: A Review. *Curr Pharm Des* 2016; 22(19): 2796-807. [Internet]. [http://dx.doi.org/10.2174/1381612822666160217125215] [PMID: 26898742]
- [63] Nishiyama N, Kato Y, Sugiyama Y, Kataoka K. Cisplatin-loaded polymer-metal complex micelle with time-modulated decaying property as a novel drug delivery system. *Pharm Res* 2001; 18(7): 1035-41. [http://dx.doi.org/10.1023/A:1010908916184] [PMID: 11496942]
- [64] Gaucher G, Dufresne MH, Sant VP, Kang N, Maysinger D, Leroux JC. Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. *J Control Release* 2005; 109(1-3): 169-88. [http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.09.034] [PMID: 16289422]
- [65] Biswas S, Kumari P, Lakhani PM, Ghosh B. Recent advances in polymeric micelles for anti-cancer drug delivery. *Eur J Pharm Sci* 2016; 83: 184-202. [http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2015.12.031] [PMID: 26747018]
- [66] Yokoyama M. Polymeric micelles as a new drug carrier system and their required considerations for clinical trials. *Expert Opin Drug Deliv* 2010; 7(2): 145-58. [Internet]. [http://dx.doi.org/10.1517/17425240903436479] [PMID: 20095939]
- [67] Lu Y, Park K. Polymeric micelles and alternative nanonized delivery vehicles for poorly soluble drugs. *Int J Pharm* 2013; 453(1): 198-214. [Internet]. [http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.08.042] [PMID: 22944304]
- [68] Hu X, Han R, Quan LH, Liu CY, Liao YH. Stabilization and sustained release of zeolene, a soft cytotoxic drug, within polymeric micelles for local antitumor drug delivery. *Int J Pharm* 2013; 450(1-2): 331-7. [http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.04.007] [PMID: 23587966]
- [69] Wei Z, Hao J, Yuan S, *et al.* Paclitaxel-loaded Pluronic P123/F127 mixed polymeric micelles: formulation, optimization and in vitro characterization. *Int J Pharm* 2009; 376(1-2): 176-85. [http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.04.030] [PMID: 19409463]
- [70] Blanco E, Kessinger CW, Sumer BD, Gao J. Multifunctional micellar nanomedicine for cancer therapy. *Exp Biol Med (Maywood)* 2009; 234(2): 123-31. [Internet]. [http://dx.doi.org/10.3181/0808-MR-250] [PMID: 19064945]
- [71] Glisoni RJ, Sosnik A. Encapsulation of the Antimicrobial and Immunomodulator Agent Nitazoxanide Within Polymeric Micelles. *Nanosci Nanotechnol* 2013; 13: 1-13.
- [72] Kunnumakkara AB, Bordoloi D, Padmavathi G, *et al.* Curcumin, the golden nutraceutical: multitargeting for multiple chronic diseases. *Br J Pharmacol* 2017; 174(11): 1325-48. [http://dx.doi.org/10.1111/bph.13621] [PMID: 27638428]
- [73] Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: the story so far. *Eur J Cancer* 2005; 41(13): 1955-68. [http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2005.05.009] [PMID: 16081279]
- [74] Chen LC, Chen YC, Su CY, Wong WP, Sheu MT, Ho HO. Development and Characterization of Lecithin-based Self-assembling Mixed Polymeric Micellar (saMPMs) Drug Delivery Systems for Curcumin. *Sci Rep. Nature Publishing Group* 2016; 6: 1-12. [Internet].
- [75] Naksuriya O, Shi Y, van Nostrum CF, Anuchapreeda S, Hennink WE, Okonogi S. HPMA-based polymeric micelles for curcumin solubilization and inhibition of cancer cell growth. *Eur J Pharm Biopharm* 2015; 94: 501-12. [http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.06.010] [PMID: 26134273]
- [76] Anantaworasakul P, Okonogi S. Encapsulation of *Sesbania grandiflora* extract in polymeric micelles to enhance its solubility, stability, and antibacterial activity. *J Microencapsul* 2017; 34(1): 73-81. [http://dx.doi.org/10.1080/02652048.2017.1284277] [PMID: 28097930]
- [77] Duarte MC, Lage LM dos R, Lage DP, *et al.* Treatment of murine visceral leishmaniasis using an 8-hydroxyquinoline-containing polymeric micelle system. *Parasitol Int* 2016; 65(6 Pt A): 728-36. [http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2016.07.005] [PMID: 27425599]
- [78] Singh Y, Meher JG, Raval K, *et al.* Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *J Control Release* 2017; 252: 28-49. [Internet]. [http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.03.008] [PMID: 28279798]
- [79] Campana R, Casettari L, Fagioli L, Cespi M, Bonacucina G, Bafone W. Activity of essential oil-based microemulsions against *Staphylococcus aureus* biofilms developed on stainless steel surface in different culture media and growth conditions. *Int J Food Microbiol* 2017; 241: 132-40. [Internet]. [http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.021] [PMID: 27770682]
- [80] Vaidya VR, Mahendrakumar CB, Bhise KS. Formulation Development and Evaluation of Microemulsion Gel System of Extract of *Quercus Infectoria Oliv.* for Topical Use. *Int J Res Ayurveda Pharm* 2016; 7: 128-32. [Internet]. [http://dx.doi.org/10.7897/2277-4343.07143] [PMID: 27770682]
- [81] Xu J, Fan QJ, Yin ZQ, *et al.* The preparation of neem oil microemulsion (*Azadirachta indica*) and the comparison of acaricidal time between neem oil microemulsion and other formulations in vitro. *Vet Parasitol* 2010; 169(3-4): 399-403. [http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.01.016] [PMID: 20304561]
- [82] Pant M, Dubey S, Patanjali PK, Naik SN, Sharma S. Insecticidal activity of eucalyptus oil nanoemulsion with karanja and jatropha aqueous filtrates. *Int Biodeterior Biodegrad* [Internet] Elsevier Ltd 2014; 91: 119-27.

- [83] Moustafa HZ, Mohamad TGM, Torkey H. Effect of Formulated Nanoemulsion of Eucalyptus Oil on the Cotton Bollworms Effect of Formulated Nanoemulsion of Eucalyptus Oil on the Cotton Bollworms. *J Biol Chem Res* 2015; 32: 478-84. [http://dx.doi.org/10.1016/j.jbi.2013.11.019]
- [84] Fernandes CP, de Almeida FB, Silveira AN, *et al.* Development of an insecticidal nanoemulsion with *Manilkara subsericea* (Sapotaceae) extract. *J Nanobiotechnology* 2014; 12: 22. [http://dx.doi.org/10.1186/1477-3155-12-22] [PMID: 24886215]
- [85] Otto A, du Plessis J, Wiechers JW. Formulation effects of topical emulsions on transdermal and dermal delivery. *Int J Cosmet Sci* 2009; 31(1): 1-19. [http://dx.doi.org/10.1111/j.1468-2494.2008.00467.x] [PMID: 19134123]
- [86] Patravale VB, Mandawgade SD. Novel cosmetic delivery systems: an application update. *Int J Cosmet Sci* 2008; 30(1): 19-33. [http://dx.doi.org/10.1111/j.1468-2494.2008.00416.x] [PMID: 18377627]
- [87] Oshiro JA, Nasser NJ, Chiari-andréo BG, Cuberes T, Chiavacci LA. Study of triamcinolone release and mucoadhesive properties of macroporous hybrid films for oral disease treatment. 2018; 8-10. [http://dx.doi.org/10.1088/2057-1976/aaa84b]
- [88] dos Santos Ramos MA, Calixto G, de Toledo LG, *et al.* Liquid crystal precursor mucoadhesive system as a strategy to improve the prophylactic action of *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland against infection by *Candida krusei*. *Int J Nanomedicine* 2015; 10: 7455-66. [http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S92638] [PMID: 26719688]
- [89] Bento P, Maria G, Calixto F, Augusto J, Júnior O, Lana R, *et al.* Correlation Between Rheological Properties and Anti-inflammatory Efficacy of Green Tea Extract-loaded Nanostructured Systems Intended For Skin Delivey. 1-16.
- [90] Dos Santos Ramos MA, de Toledo LG, Calixto GM, *et al.* *Syngonanthus nitens* Bong. (Ruhl.)-loaded nanostructured system for Vulvovaginal candidiasis treatment. *Int J Mol Sci* 2016; 17(8): 17. [http://dx.doi.org/10.3390/ijms17081368] [PMID: 27556451]
- [91] Choi JH, Cho CW, Kim JH, Park SH, Chang S, Yu YB. Liquid Crystal Formulation and Optimization of Anti-Microbial Polyherbal Ointment. *J Nanosci Nanotechnol* 2015; 15(8): 5656-9. [http://dx.doi.org/10.1166/jnn.2015.10461] [PMID: 26369133]
- [92] Taylor P, Santos ODH, Morais JM, Andrade FF, Filho PAR, Aguiar TA. Development of Vegetable Oil Emulsions with Lamellar Liquid-Crystalline Structures Development of Vegetable Oil Emulsions with Lamellar Liquid-Crystalline Structures 2018.
- [93] Morais GG, Santos ODH, Masson DS, Oliveira WP, Rocha Filho PA. Development of O/W emulsions with annatto oil (*Bixa orellana*) containing liquid crystal. *J Dispers Sci Technol* 2005; 26: 591-6. [http://dx.doi.org/10.1081/DIS-200057647]
- [94] Silva SAM, Valarini MFC, Chorilli M, Friberg SE, Leonardi GR. Minimum Evaporation Model of Dermatological Delivery Systems. Lamellar Liquid Crystal Formulations Containing Brazilian Nut (*Bertholletia excelsa* HBK) Vegetable Oil and Guarana Glycolic Extract. *J Dispers Sci Technol* 2014; 35: 1191-9. [http://dx.doi.org/10.1080/01932691.2013.826586]
- [95] Kenry CTL. Nanofiber technology: current status and emerging developments. *Prog Polym Sci* 2017; 70: 1-17. [http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2017.03.002]
- [96] Teixeira E de M, Oliveira CR de, Mattoso LHC, Corrêa AC, Paladini PD. Nanofibras de algodão obtidas sob diferentes condições de hidrólise ácida. *Polimeros* 2010; 20: 264-8. [Internet]. [http://dx.doi.org/10.1590/S0104-14282010005000046]
- [97] Huang ZM, Zhang YZ, Kotaki M, Ramakrishna S. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Compos Sci Technol* 2003; 63: 2223-53. [Internet]. [http://dx.doi.org/10.1016/S0266-3538(03)00178-7]
- [98] Zahedi P, Rezaeian I, Ranaei-Siadat SO, Jafari SH, Supaphol P. A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages. *Polym Adv Technol* 2010; 21: 77-95.
- [99] Suganya S, Senthil Ram T, Lakshmi BS, Giridev VR. Herbal drug incorporated antibacterial nanofibrous mat fabricated by electrospinning: An excellent matrix for wound dressings. *J Appl Polym Sci* 2011; 121: 2893-9. [http://dx.doi.org/10.1002/app.33915]
- [100] Charemsriwilaiwat N, Rojanarata T, Ngawhirunpat T, Sukma M, Opanasopit P. Electrospun chitosan-based nanofiber mats loaded with *Garcinia mangostana* extracts. *Int J Pharm* 2013; 452(1-2): 333-43. [http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.05.012] [PMID: 23680732]
- [101] Bonan RF, Bonan PRF, Batista AUD, *et al.* In vitro antimicrobial activity of solution blow spun poly(lactic acid)/polyvinylpyrrolidone nanofibers loaded with *Copaiba* (*Copaifera* sp.) oil. *Mater Sci Eng C* 2015; 48: 372-7. [http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2014.12.021] [PMID: 25579936]
- [102] Yan F, Li L, Deng Z, *et al.* Paclitaxel-liposome-microbubble complexes as ultrasound-triggered therapeutic drug delivery carriers. *J Control Release* 2013; 166(3): 246-55. [http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.12.025] [PMID: 23306023]
- [103] Needham D, Anyarambhatla G, Kong G. A New Temperature-sensitive Liposome for Use with Mild Hyperthermia: Characterization and Testing in a Human Tumor Xenograft Model Advances in Brief A New Temperature-sensitive Liposome for Use with Mild Hyperthermia: Characterization and Testing in a H. 2000; 1197-201.
- [104] Samad A, Sultana Y, Aqil M. Liposomal drug delivery systems: an update review. *Curr Drug Deliv* 2007; 4(4): 297-305. [Internet]. [http://dx.doi.org/10.2174/156720107782151269] [PMID: 17979650]
- [105] Amaral ACF, Gomes LA, Silva JRDA, Ferreira JLP, Ramos ADS, Rosa MDSS, *et al.* Liposomal formulation of turmerone-rich hexane fractions from *curcuma longa* enhances their antileishmanial activity 2014.
- [106] Aditya NP, Chimote G, Gunalan K, Banerjee R, Patankar S, Madhusudhan B. Curcuminoids-loaded liposomes in combination with arteether protects against *Plasmodium berghei* infection in mice. *Exp Parasitol* 2012; 131(3): 292-9. [http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2012.04.010] [PMID: 22561991]
- [107] Barros NB, Migliaccio V, Facundo VA, *et al.* Liposomal-lupane system as alternative chemotherapy against cutaneous leishmaniasis: macrophage as target cell. *Exp Parasitol* 2013; 135(2): 337-43. [http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2013.07.022] [PMID: 23933281]
- [108] Aisha AFA, Majid AMSA, Ismail Z. Preparation and characterization of nano liposomes of *Orthosiphon stamineus* ethanolic extract in soybean phospholipids. *BMC Biotechnol* 2014; 14: 23. [http://dx.doi.org/10.1186/1472-6750-14-23] [PMID: 24674107]
- [109] Chorachoo J, Annuaikitt T, Voravuthikunchai SP. Liposomal encapsulated rhodomlyrtone: a novel antiaene drug. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013; 2013157635 [http://dx.doi.org/10.1155/2013/157635] [PMID: 23762104]
- [110] Gortzi O, Lalas S, Chinou I, Tsaknis J. Reevaluation of bioactivity and antioxidant activity of *Myrtus communis* extract before and after encapsulation in liposomes. *Eur Food Res Technol* 2008; 226: 583-90. [http://dx.doi.org/10.1007/s00217-007-0592-1]
- [111] Krettli AU, Andrade-Neto VF, Brandão MG, Ferrari WM. The search for new antimalarial drugs from plants used to treat fever and malaria or plants randomly selected: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001; 96(8): 1033-42. [http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762001000800002] [PMID: 11784919]
- [112] Lundstrom K. Unlocking the therapeutic potential of plant extracts. *Future Med Chem* 2016; 8(3): 245-8. [http://dx.doi.org/10.4155/fmc-2015-0012] [PMID: 26900018]
- [113] Gibbons S. An overview of plant extracts as potential therapeutics. *Expert Opin Ther Pat* 2003; 13: 489-97. [http://dx.doi.org/10.1517/13543776.13.4.489]
- [114] Kim JH, Park SM, Ha HJ, *et al.* *Opuntia ficus-indica* attenuates neuronal injury in vitro and in vivo models of cerebral ischemia. *J Ethnopharmacol* 2006; 104(1-2): 257-62. [http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2005.09.017] [PMID: 16243466]
- [115] Groppo FC, Bergamaschi CdeC, Cogo K, Franz-Montan M, Motta RH, de Andrade ED. Use of phytotherapy in dentistry. *Phytother Res* 2008; 22(8): 993-8. [http://dx.doi.org/10.1002/ptr.2471] [PMID: 18570269]
- [116] Jeronsia JE, Joseph LA, Vinosha PA, Mary AJ, Das SJ. *Camellia sinensis* leaf extract mediated synthesis of copper oxide nanostruc-

- tures for potential biomedical applications. *Mater Today Proc* 2019; 8: 214-22.  
[<http://dx.doi.org/10.1016/j.matpr.2019.02.103>]
- [117] Mashwani ZU, Khan T, Khan MA, Nadhman A. Synthesis in plants and plant extracts of silver nanoparticles with potent antimicrobial properties: current status and future prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015; 99(23): 9923-34.  
[<http://dx.doi.org/10.1007/s00253-015-6987-1>] [PMID: 26392135]
- [118] Zorzi GK, Carvalho ELS, Von Poser GL, Teixeira HF. On the use of nanotechnology-based strategies for association of complex matrices from plant extracts. *Rev Bras Farmacogn* 2015; 25: 426-36.  
[<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2015.07.015>]
- [119] Ghosh S, Patil S, Ahire M, *et al.* Synthesis of silver nanoparticles using *Dioscorea bulbifera* tuber extract and evaluation of its synergistic potential in combination with antimicrobial agents. *Int J Nanomedicine* 2012; 7: 483-96.  
[PMID: 22334779]
- [120] Souza EPSS, Faria RX, Rocha LM. Clinical trials studies of plant extracts with anti-inflammatory activity. *J Appl Pharm Sci* 2016; 6(12): 224-32.  
[<http://dx.doi.org/10.7324/JAPS.2016.601233>]
- [121] Basu P, Dutta S, Begum R, *et al.* Clearance of cervical human papillomavirus infection by topical application of curcumin and curcumin containing polyherbal cream: a phase II randomized controlled study. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14(10): 5753-9.  
[<http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2013.14.10.5753>] [PMID: 24289574]

#### 4.3 ARTIGO A SER SUBMETIDO

**Desenvolvimento de dispositivo baseado em nanofibras poliméricas incorporando extrato seco de *Schinopsis brasiliensis* Engler para tratamento de estomatite protética.**

Título breve: **Nanofibras poliméricas incorporando extrato de *Schinopsis brasiliensis* Engler**

Brenna Louise Cavalcanti Gondim<sup>1</sup>, Tatiana Rita de Lima Nascimento<sup>2,3</sup>, Lúcio Roberto Cançado Castellano<sup>3,4</sup>, Éliton Souto de Medeiros<sup>5</sup>, Ricardo Dias de Castro<sup>4</sup>, Ana Cláudia Dantas de Medeiros<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, PB, Brasil.*

<sup>2</sup>*Núcleo de Pesquisa e Extensão de Combustíveis e de Materiais (NPE - LACOM), Department of Chemistry, Universidade Federal Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil.*

<sup>3</sup>*Grupo de Estudos e Pesquisas em Imunologia Humana (GEPIH), Escola Técnica de Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil.*

<sup>4</sup>*Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal da Paraíba, PB, Brasil.*

<sup>5</sup>*Laboratório de Materiais e Biosistemas (LAMAB), Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, PB, Brasil.*

**Autor correspondente:**

Ana Cláudia D. Medeiros

Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Universidade Estadual da Paraíba

Rua Baraúnas 351 Bairro Universitário Campina Grande-PB 58429-500 Brazil

E-mail: anaclaudia@uepb.edu.br

## ABSTRACT

**Objective:** To develop and characterize polymeric nanofibers of PLA / PEG incorporated with dry leaf extract of *Schinopsis brasiliensis* Engl. for the treatment of prosthetic stomatitis. **Design:** The minimum inhibitory/fungicidal concentrations (MIC/MFC) of the nebulized extract of *S. brasiliensis* against *Candida* spp. were determined. Solution blowing spinning (SBS) method was used for the production of polymeric nanofibers, PLA/PEG (70/30%) and concentration of 10% of the extract in the concentrations of 10X to MIC/2, MIC, MICx2 and MICx4, and characterized by scanning electron microscopy, infra-red spectrophotometry and thermal behavior. The action of nanofibers on growth kinetics by counting colony-forming units (CFU) was evaluated on multi-species inoculum. For biocompatibility assays the Vero cell line was adopted. Data were analyzed by ANOVA One Way, Tukey's multiple post-hoc, Kruskal Wallis test and Dunn's post hoc ( $\alpha=0.05$ ). **Results:** The MIC<sub>88.8%</sub> of *S. brasiliensis* was 62.5  $\mu\text{g/mL}$ . The MFC/MIC ratio revealed fungicidal activity of the extract for all strains. The morphology of the nanofibers was as expected by the SBS technique in all tested compositions. The analysis of the nanofibers diameter revealed that the addition of *S. brasiliensis* extract produced less thick fibers ( $p<0.05$ ) when compared to PLA/PEG fibers. The PLA/PEG/Bra fibers showed loss of mass in two stages. The spectra that prove the functional groups of the *S. brasiliensis* extract are related to the groups present in gallic acid in waves 2926, 1713 and 1265  $\text{cm}^{-1}$ . The PLA/PEG/Bra 2500 nanofiber was able to reduce fungal growth after 4 hours of incubation, similar to that observed when compared to nystatin in the MIC concentration. All nanofibers were compatible with use in mammals. **Conclusions:** PLA/PEG polymeric nanofibers, produced by SBS, incorporating *S. brasiliensis* extract in different concentrations, proved to be biocompatible for use in humans, being able to inhibit the growth of *Candida* spp. This study points to the potential application of nanofibers incorporated with plant extracts to control prosthetic stomatitis.

**Keywords:** Denture Stomatitis, Therapeutics, Plant Extracts, Nanofibers, *Candida* spp.

## 1. Introdução

A candidíase oral em pacientes portadores de prótese dentária, também conhecida como estomatite protética, é uma infecção fúngica oportunista que ocorre quando existe o crescimento excessivo de leveduras do gênero *Candida* spp., com destaque para espécie *C. albicans* (Wady et al., 2012). Como tratamento convencional indica-se a limpeza e substituição de próteses contaminadas por fungos, em associação à quimioterapia para tratamento das manifestações em mucosa do paciente (Marra et al., 2012; Paranhos et al., 2014; Yildirim-Bicer, Peker, Akca, & Celik, 2014). O uso de soluções de hipoclorito de sódio a 1% pode afetar as características da prótese e promover desgaste excessivo do material (Gondim et al., 2018), ao passo que o tratamento clínico baseado no uso de antifúngicos das classes dos azólicos e poliênicos, apresenta reações adversas, irritação na mucosa oral e indução de perfil de resistência das cepas fúngicas (Gad & Fouda, 2020).

Alternativamente, o uso de produtos naturais e de medicamentos fitoterápicos vem sendo buscado como auxiliar ou mesmo como substituição do tratamento convencional baseado em fármacos sintéticos. Vislumbra-se a possibilidade de diminuir os efeitos deletérios do tratamento convencional tanto no material de prótese, como em mucosa oral do paciente (Gondim et al., 2018; Marcos-Arias, Eraso, Madariaga, & Quindós, 2011). Acredita-se que cerca de 10.000 espécies de plantas tenham aplicações médicas. Dentre elas, encontra-se a *Schinopsis brasiliensis* Engler, uma planta muito presente no nordeste do Brasil, na região do bioma da Caatinga. O extrato da planta demonstrou alto teor de compostos fenólicos, como taninos e flavonoides, com maior concentração de taninos, correspondendo a grande parte do conteúdo fenólico total (dos Reis Luz et al., 2018; Fernandes et al., 2015). A presença desses constituintes químicos tem sido relatada como os responsáveis pelas promissoras ações antimicrobianas, antifúngicas e anti-inflamatórias (Formiga Filho et al., 2015; Jovito, 2016; Saraiva et al., 2013).

Contudo, considerando a grande variedade desses metabólitos presentes nas plantas, estratégias para a liberação controlada dos fitoconstituintes tornam-se desejáveis. Desta forma, torna-se possível controlar ou mesmo inibir a degradação dos compostos bioativos ao longo do tempo de uso em ambiente vivo, assim como facilitar o processo de preparo de formulações farmacêuticas, aumentando a aderência ao uso do produto pelo paciente. A liberação controlada permite, ainda, diminuição dos efeitos colaterais e tóxicos ao organismo humano (Gondim et al., 2019; Simona, Florina, Rodica, Evelyne, & Maria-Corina, 2017).

Devido às suas propriedades químicas e físicas, os nanomateriais têm sido amplamente utilizados no desenvolvimento e na administração de medicamentos (Aldrich,

Kuss, Duan, & Kielian, 2019; Bonan et al., 2017, 2015; Han et al., 2018). Nanoestruturas poliméricas, em geral, apresentam ótima biocompatibilidade, biodegradabilidade, tolerabilidade e mucoadesividade, sendo indicados como bons sistemas de liberação controlada de fármacos (Aldrich et al., 2019; Han et al., 2018). Apresentam-se termicamente e mecanicamente estáveis (Dumitriu et al., 2014; Medeiros, Glenn, Klamczynski, Orts, & Mattoso, 2009; Pelipenko, Kocbek, & Kristl, 2015; Rezaei, Ghani, Shoushtari, & Rabiee, 2016), sendo compostas por estruturas amorfas ou semi-cristalinas de várias formas, como nanoesferas, nanopartículas, filmes e nanofibras (Rezaei et al., 2016; Vasita & Katti, 2019). Neste sentido, as nanofibras a base de polímeros naturais ou sintéticos podem ser utilizados como sistemas de administração de medicamentos baseada em sistemas capazes de controlar e até prolongar a liberação do medicamento.

Dentre os polímeros sintéticos utilizados para a confecção de nanofibras para sistemas de liberação, o PLA tem sido amplamente utilizado devido à sua excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade (Bhattarai et al., 2009; Ivanova, Bazaka, & Crawford, 2014; Lutz & Hoth, 2006; Xu et al., 2009). Entretanto, o PLA apresenta algumas limitações principalmente para a engenharia biomédica, como sua baixa taxa de degradação e a presença de grupos laterais hidrofóbicos com baixa reatividade. Diante disso, várias técnicas vêm sendo utilizadas para melhorar as propriedades físicas, químicas e biológicas do PLA, sendo a mais comum a formação de blendas do PLA com diferentes outros polímeros que podem ou não ser degradáveis (Ivanova et al., 2014; Xu et al., 2009). Dentre os polímeros combinados ao PLA, o poly(ethylene glycol) (PEG) é um dos mais comumente usados (Wang, Sun, Yin, & Xu, 2019). Isto se deve, principalmente pela sua excelente solubilidade em água e em solventes orgânicos (Lutz & Hoth, 2006). Além disso, PEG apresenta baixa toxicidade e ausência de imunogenicidade em humanos, além de boa biodegradabilidade e fácil eliminação renal (Ivanova et al., 2014; Ni et al., 2014; Zander, Hua, Wiener, Vogt, & Becker, 2015).

Levando-se em consideração que as nanofibras podem ser utilizadas como dispositivos de liberação controlada de fármacos e que estes visam manter a concentração do fármaco em níveis terapêuticos por maiores períodos de tempo (Bonan et al., 2015), estudos que avaliem a ação de nanofibras poliméricas carreando fármacos e extratos de plantas sobre *Candida* spp., se fazem importantes. A utilização desses dispositivos para a liberação controlada dos fármacos objetiva reduzir a toxicidade terapêutica. Também permite que concentrações minimamente efetivas atuem constantemente através do contato direto, com ação tópica e com pouca repercussão sistêmica. Diante disso, o objetivo deste estudo foi

desenvolver e caracterizar nanofibras poliméricas de PLA/PEG incorporadas com extrato seco da folha da *S. brasiliensis* para tratamento de estomatite protética, avaliar a atividade antifúngica sobre *Candida* spp. e sua compatibilidade em linhagens de células Vero.

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1 Obtenção dos extratos da *S. brasiliensis***

O extrato nebulizado da folha da *S. brasiliensis* foi preparado pelo Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos (LABDEM) da Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, Paraíba e depositadas no herbarium Professor Jayme Coelho (Herbarium Code EAN) da Universidade Federal da Paraíba sob o número EAN-14049. Os extratos então foram gentilmente cedidos para o uso neste projeto e as caracterizações dos extratos encontram-se publicados (FERNANDES *et al.*, 2015).

### **2.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)**

A determinação da CIM dos extratos foi realizada contra cepas de *C. albicans* ATCC 90028, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. krusei* ATCC 341 e *C. glabrata* ATCC 2001 e sobre três cepas de *C. albicans* e duas de *C. tropicalis* de isolados clínicos de paciente com mucosite oral cedidos pelo Laboratório de Farmacologia Experimental e Cultivo Celular – CCS/UFPB utilizando a técnica da microdiluição (CLSI, 2008). Após a distribuição de 100 µL de caldo Sabouraud Dextrose (CSD) (KASVI, Curitiba, PR, Brasil) nos orifícios das placas de microdiluição, 100 µL dos extratos na concentração inicial de 4 mg/mL foi distribuído em cada poço e diluídos seriadamente. Por fim, foram dispensadas alíquotas de 100 µL do inóculo, padronizado a  $2,5 \times 10^3$  CFU/mL em espectrofotometria (abs 0,08–0,1 em filtro 530 nm) (Freires *et al.*, 2014; Gondim *et al.*, 2018). Foi utilizada a nistatina (3M, São Paulo, Brasil) em uma concentração inicial de 96 µg/mL e o ácido gálico a uma concentração inicial de 4 µg/mL. Controles de viabilidade celular, esterilidade média e solução de ácido gálico (componente majoritário do extrato) foram realizados simultaneamente com o ensaio. Os ensaios foram realizados em triplicata e as placas incubadas por 24h a 35°C. A CIM foi considerada a menor concentração capaz de inibir visivelmente o crescimento das leveduras utilizadas no ensaio, confirmado pelo corante TTC (2,3,5 cloreto de trifetil tetrazólico) (DINÂMICA, São Paulo, Brasil) no volume de 10 µL (Gondim *et al.*, 2018).



Em seguida, foram retiradas alíquotas de 50 µL das subculturas correspondentes ao CIM, CIM x 2 e CIM x 4 e inseridas em placas de Petri contendo Agar Sabouraud Dextrose (ASD) (KASVI, Curitiba, PR, Brasil). As placas foram incubadas a 35°C por 24 h. A CFM foi considerado a menor concentração das soluções que impediu o crescimento visível no subcultivo. A relação CFM/CIM foi calculada e determinou-se o efeito fungistático ( $CFM / CIM \geq 4$ ) ou fungicida ( $CFM / CIM < 4$ ) de cada solução (Gondim et al., 2018; Mayer, Wilson, & Hube, 2013).

## **2.3 Confeção das Nanofibras**

### **2.3.1 Materiais**

Para a confecção das nanofibras foram utilizados os polímeros: Poli (D, L- ácido láctico), PDLLA, (PLA 4060D, Massa Molar = 120 kg.mol<sup>-1</sup>) e poli (etilenoglicol) PEG foram obtidos de Jamplast MO USA em forma de pellets. Clorofórmio (ClCH<sub>3</sub>, > 98% pureza), obtido da Sigma Aldrich, BR. Como solvente, foi usado o Clorofórmio (ClCH<sub>3</sub>), com > 98% pureza (Sigma Aldrich, BR).

### **2.3.2 Fiação das nanofibras de PLA/PEG incorporando extrato da *S. brasiliensis***

Para a produção das fibras poliméricas, foi utilizada a tecnologia de SBS, que consistia em um sistema de fiação (bocais concêntricos com um comprimento de protrusão de 0,5 mm), uma bomba de injeção de polímero (bomba do aparelho Harvard 11), um coletor e uma fonte de ar comprimido (Chiaperini MC 124L 7.6-2HP) (Kamyar et al., 2018). As soluções de polímero foram preparadas solubilizando PLA (15% m/v) em clorofórmio. Adicionou-se PEG à 30% (p/p) em relação ao PLA (base seca). Foi utilizado uma concentração de 10% de volume final do extrato da *S. brasiliensis* nas concentrações de 315, 625, 1250 e 2500 µg/mL que correspondem aos valores de 10 x a CIM/2, CIM, CIM x 2 e CIM x 4 (Item 2.2). As soluções poliméricas foram fiadas adotado os seguintes parâmetros: bico interno de 1,2 mm de diâmetro, tubo de saída para ar comprimido de 2 mm, distância de trabalho de 15 cm, pressão de 30 psi, taxa de fluxo de 7,2 mL/h, distância de trabalho do coletor de 200 mm (Oliveira, Medeiros, et al., 2013; Oliveira, Mattoso, Orts, & Medeiros, 2013).

### **2.3.3 Caracterizações das nanofibras**

#### **Morfologia das nanofibras**

A morfologia da superfície das fibras foi investigada usando Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV Tescan modelo Vega3 LMU). Cada amostra foi recoberta com 8 nm de camada de ouro para materiais não condutores (Gatan Model 682 Precision Etching Coating System, USA). Para cada amostra, as imagens foram obtidas utilizando detectores secundários (SE) e retroespalhados (BSD), com ampliações de 100, 500, 1.000, 5.000 e 10.000, 3-8 kV voltagem de aceleração do feixe de elétrons e spot size 1-3 para prevenir a deformação da amostra. Os diâmetros médios de 100 fibras foram contados utilizando o software ImageJ (versão 1.48, NIH, Bethesda, MD, EUA) (Medeiros et al., 2009; Santos, Viera, Oliveira, Zanin, & Borsatti, 2014).

#### **Comportamento Térmico**

A análise termogravimétrica foi realizada em analisador termogravimétrico (DTG-60, Shimadzu, Alemanha), sob atmosfera de nitrogênio, e taxa de fluxo de  $50 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . As amostras foram submetidas à temperatura de  $600^\circ\text{C}$  e com razão de aquecimento de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ , usando cadinhos de platina. A análise termogravimétrica (TG) foi realizada em equipamento DTG-60 (Shimadzu, Alemanha), empregando regime de aquecimento dinâmico no ar para garantir a remoção da fase orgânica. As amostras contendo 10 mg, cada, foram aquecidas a  $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$  a  $600^\circ\text{C}$  (Oliveira, Mattoso, et al., 2013).

#### **Estrutura química das nanofibras de PLA/PEG/Bra**

Espectros de Infravermelho (IV) das fibras foram registrados no espectrômetro IRAffinity-1/FTIR-8000 (Shimadzu, Alemanha), em modo de refletância à temperatura ambiente. Todas as amostras foram escaneadas na região de 4000 para  $400 \text{ cm}^{-1}$  com uma resolução de  $4 \text{ cm}^{-1}$  (Liu et al., 2014). Os espectros foram tirados de uma média de 40 varreduras para cada amostra, com três repetições por amostra (Bilbao-Sainz et al., 2014).

## 2.4 Testes Biológicos

### 2.4.1 Cinética de inibição multiespécies de *Candida* spp.

Para desenvolver o inóculo multiespécie foram utilizadas *C. albicans* ATCC 60193, *C. tropicalis* CBS 94 e *C. krusei* CBS 73. Os microrganismos foram cultivados em meio CSD à 35 °C por 24 h e o número de células foi ajustado para aproximadamente  $2 \times 10^3$  UFC/mL. Em seguida, a suspensão final foi preparada misturando volume igual de 5 mL de cada inóculo em um tubo de vidro. As células fúngicas foram então incubadas em placas de 96 poços, de acordo com a técnica de microdiluição, às quais foram adicionadas 10 mg das nanofibras poliméricas incorporadas com os extratos nas concentrações de 315, 625, 1250 e 2500 µg/mL.

Como controle positivo, foi utilizado a Nistatina e o extrato nas concentrações de CIM e CIMx4 (12 e 250 µg/mL, respectivamente). Em seguida, as placas foram incubadas a 35 °C por 24 h. Ao longo das 24h de incubação, alíquotas de 10 µL de cada amostra testada foram coletadas e semeadas em placas de ágar Sabouraud-Dextrose em intervalos de tempo predeterminados (0, 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas) à 35 °C e mantidas, cada alíquota, por 24 h. Controles de esterilidade do meio de cultura e viabilidade de levedura também foram realizados. O número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) viáveis foi contado e os valores foram expressos em log UFC/mL. Os resultados foram representados graficamente a curva de morte celular dos fungos em função do tempo. Os testes foram realizados em triplicata (Gondim et al., 2018).

### 2.4.2 Testes *in vitro* para compatibilidade em linhagens de células Vero

Para os ensaios de biocompatibilidade foi adotada a linhagem de células Vero (ATCC CCL-81). As células foram mantidas em Meio Essencial Mínimo (MEM) suplementado com 10% soro bovino fetal (SBF), 1% Penicilina/Estreptomicina, a 35 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Os repasses de cultivos foram feitos a cada 48h em frascos de cultivo estéreis. As células foram resuspendidas à uma concentração de  $2,5 \times 10^5$  células/mL e cultivadas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, na presença ou ausência das nanofibras produzidos. Foram usados como controles do teste as nanofibras sem extrato e etanol 70% (controle de morte celular). Os cultivos foram mantidos em contato com os materiais por 24 h para avaliação da viabilidade celular, seguindo protocolo de (Louis & Siegel, 2011). Foi realizada a contagem do número total de células viáveis e não viáveis em cada quadrante da câmara de Neubauer. A média foi calculada e multiplicada por  $10^4$  para obter o número de células por mL de amostra. Em

seguida o valor foi multiplicado por 2 para corrigir a diluição da amostra no corante azul de tripan. A determinação do percentual de células viáveis foi calculada seguindo:

$$\% \text{ Células Viáveis} = \frac{\text{Número de células viáveis}}{\text{Número total de células}}$$

## 2.7 Considerações éticas

As linhagens clínicas de *Candida* spp. foram coletadas anteriormente em projeto aprovado por CEP (protocolo CAAE: 43911715.8.0000.5188). O uso de linhagens comerciais de células Vero (ATCC CCL-81) cultivadas e mantidas em laboratório, o que dispensa aprovação em Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (CEP), assim como dispensa avaliação de Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

## 2.8 Análise estatística

Os resultados das curvas de cinética foram analisados por ANOVA One Way, seguida pela comparação múltipla de Tukey post-hoc para cada tempo para avaliar a comparação entre as nanofibras, nistatina e o controle de crescimento. Para os resultados dos testes de diâmetro das nanofibras e viabilidade celular foram apresentados como mediana de valores dos grupos testados. As comparações foram realizadas pelo teste de *Kruskal Wallis* seguido de *Dunn's post hoc* ( $\alpha=0.05$ ), usando software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

## 3. Resultados

### 3.1 Determinação da CIM e CFM

Os valores de CIM e CFM do extrato da *S. brasiliensis* contra *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei* são ilustrados na Tabela 1. Os valores de CIM encontrados nas cepas padrão variaram entre 15,6  $\mu\text{g/mL}$  para *C. krusei* ATCC 341; e 125  $\mu\text{g/mL}$  para *C. glabrata* ATCC 2001. Para *C. albicans* ATCC 90028 e *C. tropicalis* ATCC 750, o valor da CIM foi de 62,5  $\mu\text{g/mL}$  para ambas as leveduras. Para as cepas de isolados clínicos, os valores variaram 15,6 a 62,5  $\mu\text{g/mL}$ .

A concentração de 62,5  $\mu\text{g/mL}$  pode ser definida como a concentração capaz de inibir 88,8% das cepas testadas (CIM88,8%). Para o CFM, os valores das concentrações variaram

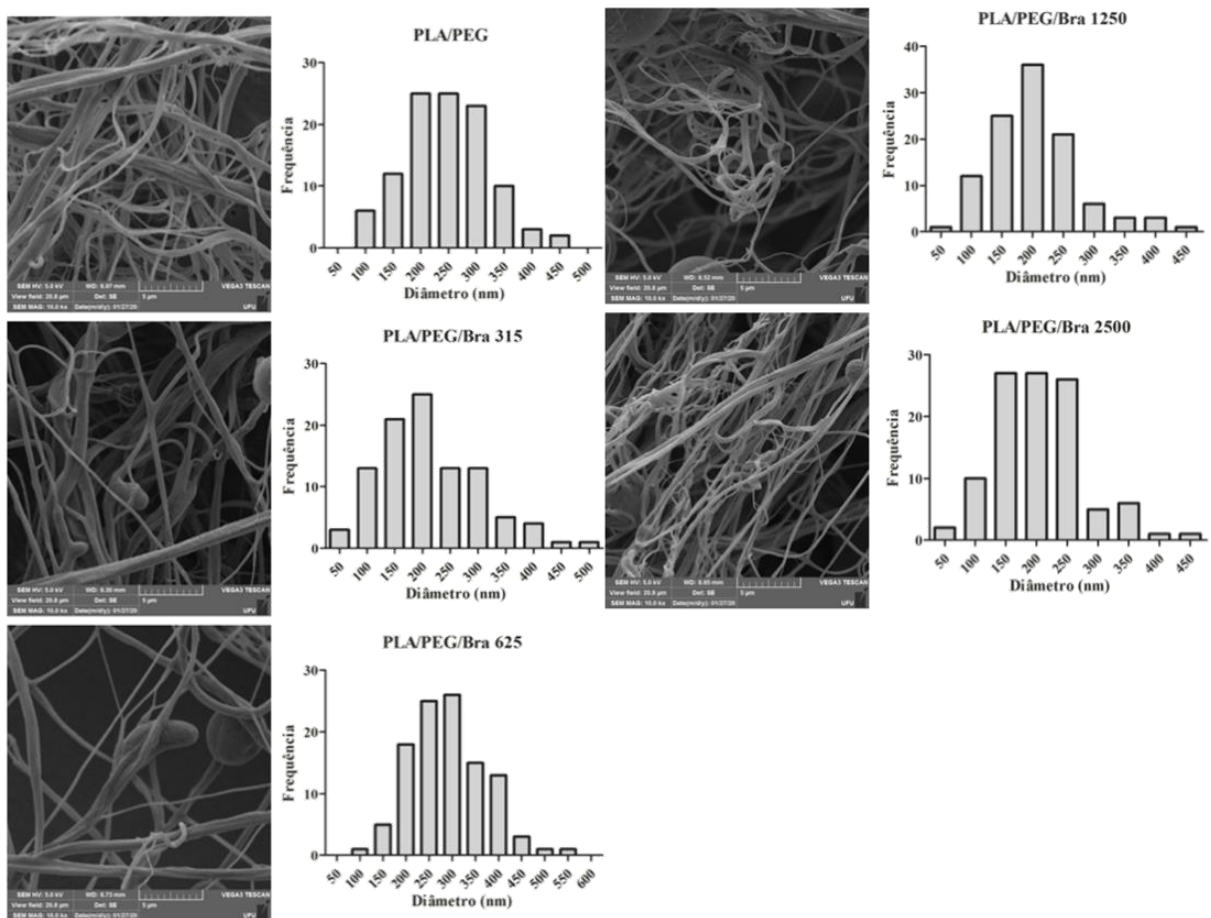
entre 15,04 a 120,31 $\mu$ g/mL. A razão CFM/CIM encontrada para todas as concentrações de soluções demonstrou efeito fungicida contra *Candida* spp. testado.

**Tabela 1.** Atividade antifúngica do extrato da *S. brasiliensis* e nistatina sobre *Candida* spp.

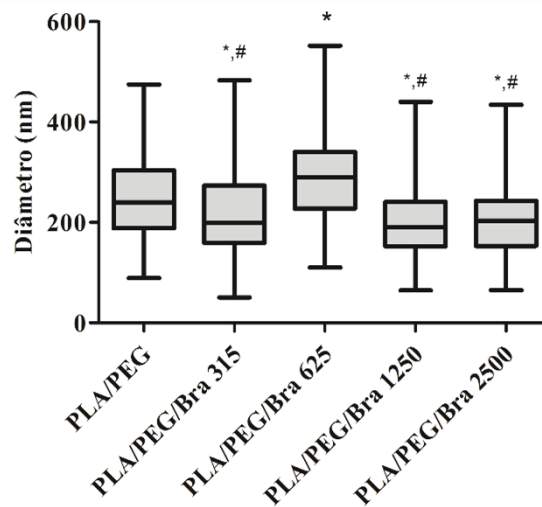
Cepas	Compostos	CIM ( $\mu$ g/mL)	CFM ( $\mu$ g/mL)	CFM/ CIM	Atividade antifúngica
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	<i>S. brasiliensis</i>	62,5	62,5	1	Fungicida
	Nistatina	6,0	6,0	1	Fungicida
<i>C. krusei</i> ATCC 341	<i>S. brasiliensis</i>	15,6	31,25	2	Fungicida
	Nistatina	6,0	6,0	1	Fungicida
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	<i>S. brasiliensis</i>	62,5	62,5	1	Fungicida
	Nistatina	12,0	12,0	1	Fungicida
<i>C. glabrata</i> ATCC 2001	<i>S. brasiliensis</i>	125	125	1	Fungicida
	Nistatina	6,0	6,0	1	Fungicida
<i>C. albicans</i> LM1	<i>S. brasiliensis</i>	62,5	125	2	Fungicida
	Nistatina	12,0	12,0	1	Fungicida
<i>C. albicans</i> LM2	<i>S. brasiliensis</i>	15,6	15,6	1	Fungicida
	Nistatina	12,0	24,0	2	Fungicida
<i>C. albicans</i> LM3	<i>S. brasiliensis</i>	15,6	31,25	2	Fungicida
	Nistatina	12,0	12,0	1	Fungicida
<i>C. tropicalis</i> LM7	<i>S. brasiliensis</i>	31,25	31,25	1	Fungicida
	Nistatina	6,0	12,0	2	Fungicida
<i>C. tropicalis</i> LM8	<i>S. brasiliensis</i>	31,25	31,25	1	Fungicida
	Nistatina	12,0	12,0	1	Fungicida

### 3.2 Determinação da morfologia das nanofibras de PLA/PEG/Bra

Após a determinação do efeito antifúngico do extrato de *S. brasiliensis* selecionados para este estudo, procedeu-se à confecção das nanofibras poliméricas pela técnica de SBS. Foram escolhidos os polímeros PLA e PEG, fiados como blenda na proporção 70:30 (p/p). Esta proporção foi mantida para todos os grupos de materiais produzidos, ocorrendo alteração na quantidade de extrato incorporado, seguindo os valores de 10 vezes mais concentrado à partir da CIM do extrato livre (Figura 1 e 2).



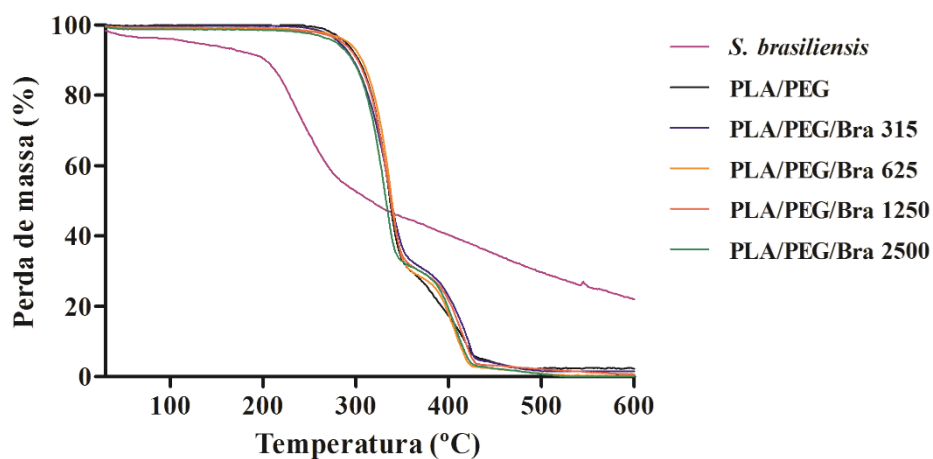
**Figura 1.** Caracterização morfológica das nanofibras por MEV.



**Figura 2.** Diâmetro médio e dispersão do diâmetro das mantas de nanofibra. (\*) comparação com PLA/PEG, (#) comparação com PLA/PEG/Bra 625.

### 3.3 Comportamento Térmico

O perfil de degradação das nanofibras foi determinado por método termogravimétrico. As curvas de TG e DTG dos polímeros de PLA/PEG com e sem extrato estão demonstradas na Figura 3.



**Figura 3.** Curvas TG, relacionando a perda de massa em função da temperatura. Atmosfera: nitrogênio/argônio e taxa de aquecimento: 10 °C/min.

Na Tabela 2, são repostadas as temperaturas de *onset*, temperaturas de máxima taxa de degradação de cada evento térmico e as respectivas porcentagens das perdas de massa.

**Tabela 2.** Temperaturas de início ( $T_{onset}$ ) e de final ( $T_{endset}$ ) de perda de massa e as degradações em porcentagens (Perda de massa %) das nanofibras PLA/PEG puras ou carreando extrato e *S. brasiliensis* Engl.

	$T_{onset}$	$T_{endset}$	Perda de	$T_{onset}$	$T_{endset}$	Perda de	$T_{onset}$	$T_{endset}$	Perda de	$T_{onset}$	$T_{endset}$	Perda de
	(°C)	(°C)	massa	(°C)	(°C)	massa	(°C)	(°C)	massa	(°C)	(°C)	Massa
			(%)			(%)			(%)			(%)
<i>S. brasiliensis</i>	38,26	66,22	2,90	211,40	262,66	41,77	292,61	382,70	27,74	532,66	556,19	14,03
PLA/PEG	314,84	346,99	65,30	349,07	374,77	32,89						
PLA/PEG/Bra 315	299,82	339,57	61,82	345,42	385,23	35,95						
PLA/PEG/Bra 625	316,82	345,69	60,53	345,69	382,18	36,65						
PLA/PEG/Bra 1250	308,16	341,92	63,03	343,61	405,85	31,41						
PLA/PEG/Bra 2500	339,12	337,07	60,02	339,82	384,92	38,37						

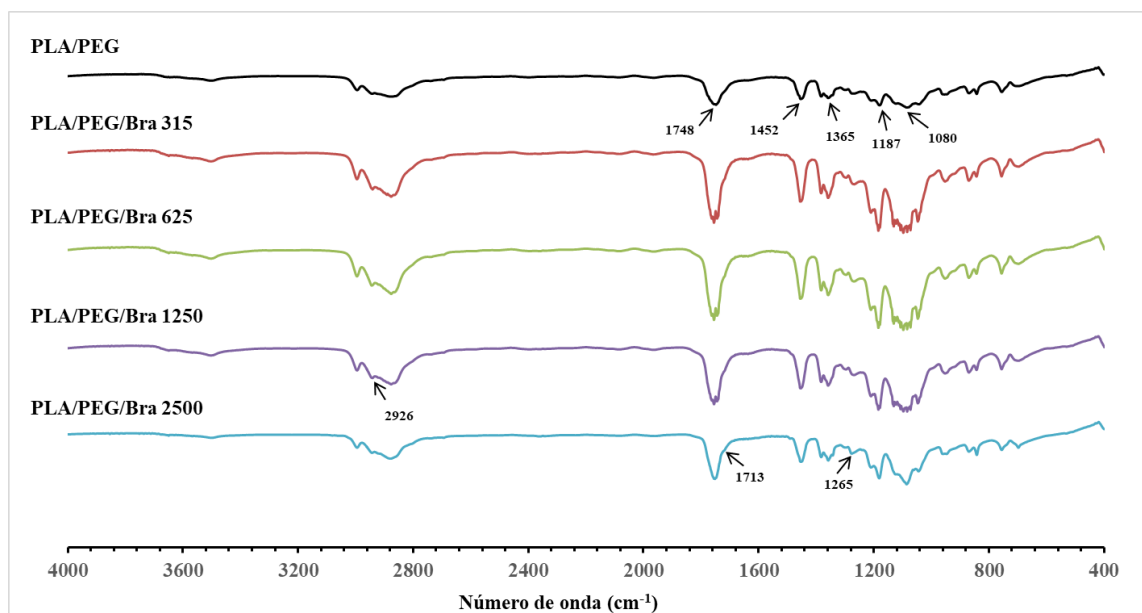


Nas fibras com blenda de PLA/PEG o processo de degradação térmica ocorre em dois estágios. O primeiro estágio corresponde a degradação do PLA e, posteriormente, à degradação do PEG (Ferreira, 2017). As fibras PLA/PEG/Bra apresentam perda de massa também em dois estágios (Ferreira, 2017). O primeiro evento está associado com sobreposição do pico referente ao início da degradação do PLA com o primeiro estágio do extrato da *S. brasiliensis*, e o segundo evento está ligado a sobreposição do pico da curva de degradação do PEG e do extrato.

#### 4.4 Estrutura química das nanofibras de PLA/PEG/Bra

A identificação das frequências de absorção dos grupos funcionais característicos das fibras de PLA/PEG com e sem extrato está representada nos espectros de infravermelho na Figura 4.

As características intermediárias deste espectro nos comprimentos de onda em 174, 1184 e 1080  $\text{cm}^{-1}$  são relativos ao estiramento do grupo carbonila (C=O), ao modo vibracional axial assimétrico e angular axial do (C-O + CH<sub>3</sub>) e ao modo axial simétrico do grupo éter (C-O-C). Os comprimentos de onda em 1452  $\text{cm}^{-1}$  e 1365  $\text{cm}^{-1}$  são correspondentes às flexões do grupo (CH<sub>2</sub>) e deformações referentes ao (CH<sub>3</sub>).



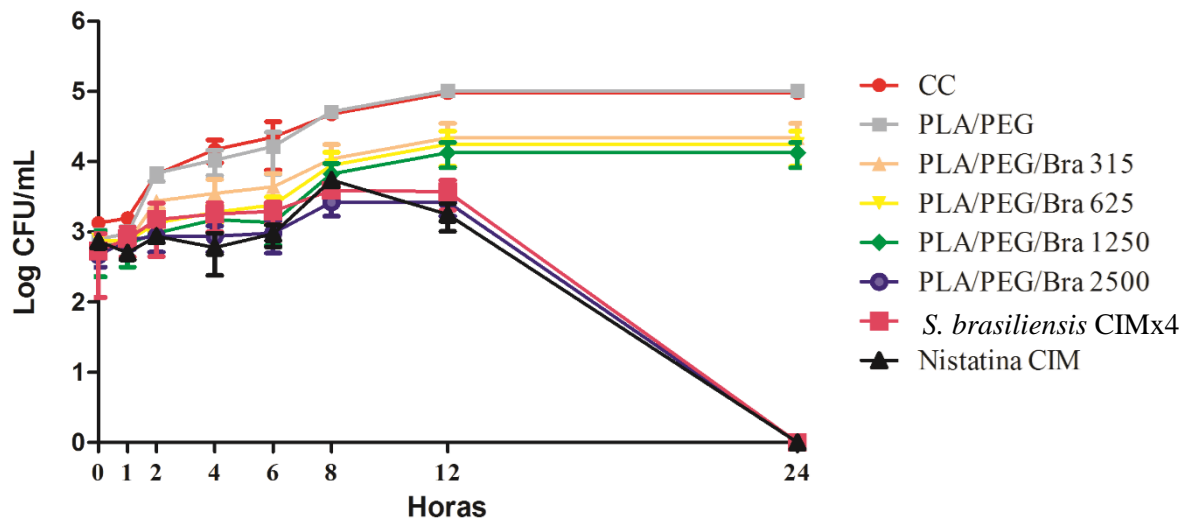
**Figura 4.** Espectros de infravermelho para fibras de PLA/PEG com e sem extrato na região de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ .

Uma faixa de comprimento de onda entre 3694 e 3292  $\text{cm}^{-1}$ , referente às hidroxilas terminais relacionadas as pontes de hidrogênio (-OH), característicos do PEG (Ferreira, 2017). Assim como uma banda intensa em 2886  $\text{cm}^{-1}$  do estiramento do (CH).

O espectro que comprova os grupos funcionais do extrato da *S. brasiliensis*, estão relacionados aos grupos presentes do ácido gálico que representa o componente majoritário do extrato. Foram encontrados os comprimentos de onda 2926  $\text{cm}^{-1}$  (estiramento C–H do anel aromático), 1713  $\text{cm}^{-1}$  (estiramento dos ácidos carboxílicos C=O) e 1265  $\text{cm}^{-1}$  (estiramento do grupo C–O do éster aromático).

### **3.5 Determinação de ação anti-*Candida* spp. das nanofibras PLA/PEG/Bra**

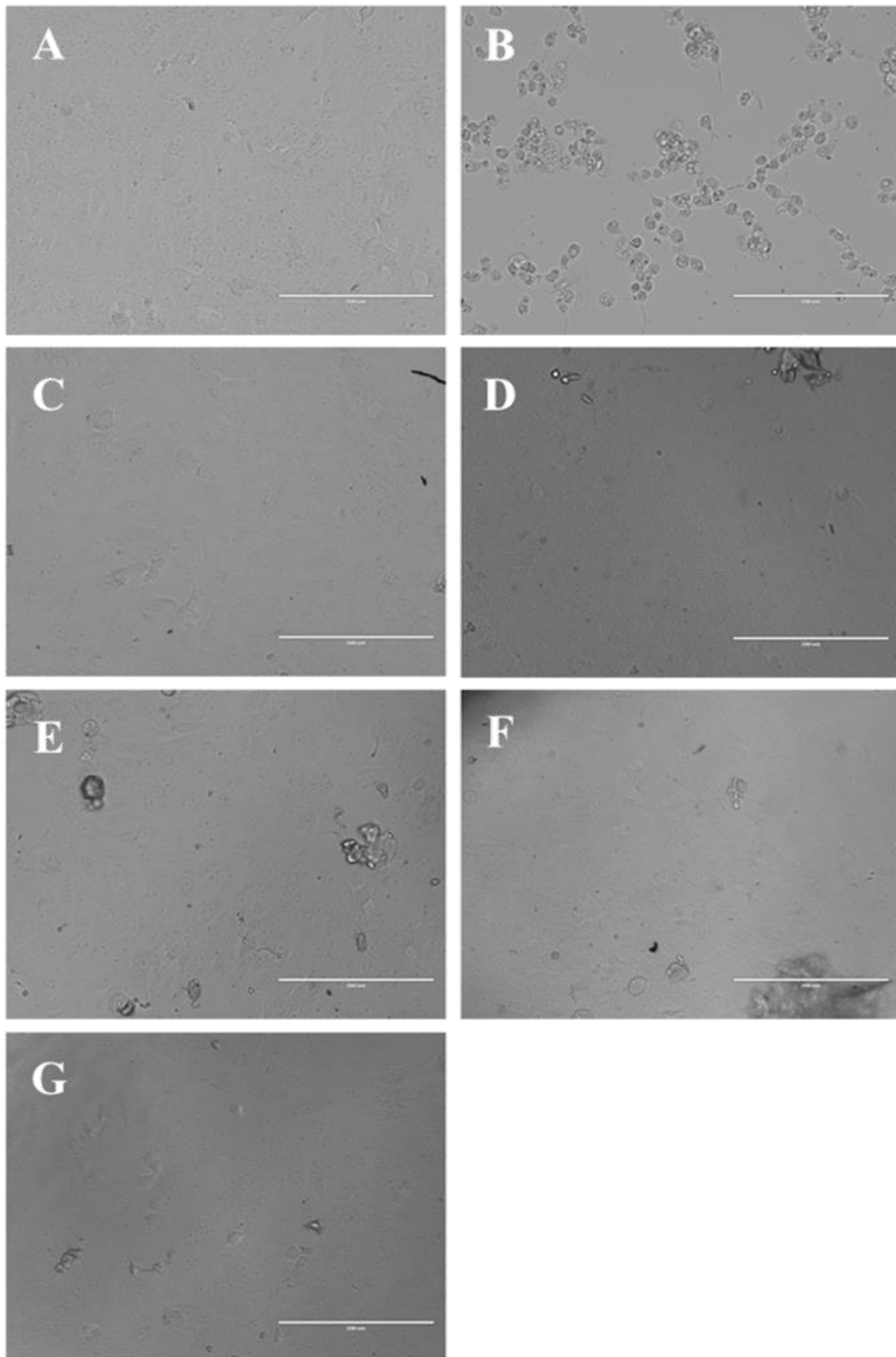
O efeito antifúngico das nanofibras foi avaliado por técnica de cinética. Ficou demonstrado que as nanofibras foram capazes de reduzir a concentração de UFC/mL de formas planctônicas de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis* cultivadas em sistema multi-espécies (Figura 5). A partir do tempo de 6 horas, a maioria das nanofibras foi capaz de inibir o crescimento dos fungos em relação ao controle de crescimento ( $p < 0,001$ ). O mesmo perfil foi observado em relação ao extrato livre de *S. brasiliensis* na concentração determinada da CIMx4 (250  $\mu\text{g/mL}$ ). Por outro lado, a atividade inibitória das amostras de nanofibras PLA/PEG/Bra 2500 foi observada à partir das 4 horas de incubação e foram semelhantes ao observado com a nistatina (12  $\mu\text{g/mL}$ ). As nanofibras de PLA/PEG sem o extrato de *S. brasiliensis* não demonstraram atividade antifúngica e seguiram o padrão do controle de crescimento. De maneira interessante, o perfil de cinética de inibição das nanofibras PLA/PEG/Bra 2500 foram semelhantes ao observado pela CIMx4 e pela nistatina, não havendo diferença entre eles, ao longo das 24 horas avaliadas.



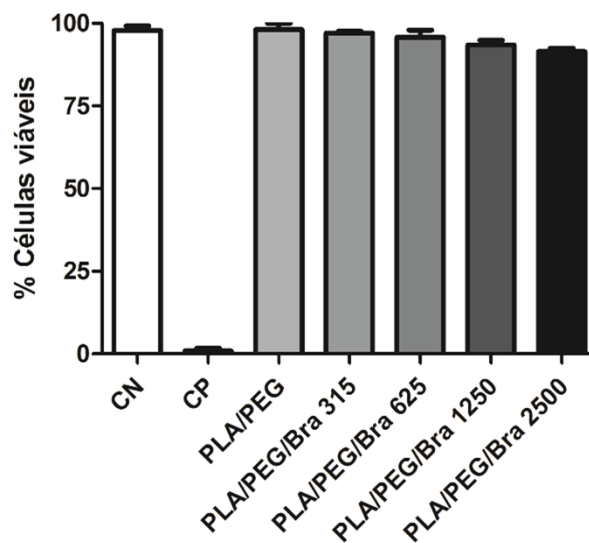
**Figura 5.** Cinética de inibição de *Candida* spp.

### 3.6 Determinação de citocompatibilidade das nanofibras PLA/PEG/Bra em células Vero.

Após observar o potencial efeito antifúngico das nanofibras, procedeu-se à avaliação de citocompatibilidade dos nanomateriais para uso em seres humanos. Para tanto, as nanofibras foram incubadas em cultivos de linhagens de células Vero (ATCC CCL-81). Conforme observado nas Figuras 6 e 7, todas as nanofibras apresentaram toxicidade comparável ao controle negativo. Não foram observadas diferenças entre os grupos de nanofibras com ou sem o extrato de *S. brasiliensis*.



**Figura 6.** Células Vero cultivadas na presença das nanofibras. (A) Controle negativo, (B) controle positivo, (C) PLA/PEG, (D) PLA/PEG/Bra 315, (E) PLA/PEG/Bra 625, (F) PLA/PEG/Bra 1250 e (G) PLA/PEG/Bra 2500.



**Figura 7.** Percentual de viabilidade de células Vero cultivadas em presença das nanofibras.

#### 4 Discussão

Existem na literatura muitos estudos avaliando a atividade antifúngica de produtos naturais, entretanto poucos avaliam e desenvolvem dispositivos de administração eficazes e controlada para esses produtos. As nanofibras poliméricas de PLA/PEG incorporando extrato da *S. brasiliensis* apresentaram resultados promissores para sua utilização como um possível dispositivo de liberação controlada para tratar as afecções orais causadas por microrganismo do gênero *Candida* spp.

Os extratos vegetais da *S. brasiliensis* apresentam compostos fenólicos, taninos e flavonóides relatados como componentes-chave na atividade antimicrobiana (Formiga Filho et al., 2015). O mecanismo de ação antimicrobiana dos taninos pode estar relacionado à sua complexação com íons metálicos, reduzindo a disponibilidade de íons essenciais ao metabolismo do microrganismo (Cowan, 1999). Flavonóides, como 2-3 flavonas e hexametoxi-flavonas, são agentes capazes de formar complexos com proteínas extracelulares solúveis e a parede celular dos microrganismos e podem romper as membranas microbianas (de Sousa Araújo, Alencar, de Amorim, de Albuquerque, 2008; Evanjelene, 2012).

Neste estudo, a CIM 88,8% do extrato da *S. brasiliensis* para as cepas testadas foi de 62,5 µg/mL, exceto para *C. glabrata* ATCC 2001 e *C. albicans* LM1 que foi de 125 µg/mL. A razão CFM/CIM refletiu a atividade fungicida da *S. brasiliensis* para todas as cepas testadas. Tem sido demonstrado que produtos naturais são considerados potenciais antimicrobianos quando apresentam uma CIM com valores igual ou inferior a 500 µg/mL (Aligiannis, Kalpoutzakis, Mitaku, & Chinou, 2001). Alguns estudos avaliaram a atividade

do extrato da folha da *S. brasiliensis* sobre *Candida* spp. e demonstraram resultados promissores da possível utilização deste extrato no tratamento das afecções causadas pelo gênero *Candida*. Esses estudos verificaram concentrações inibitórias mínimas variando de 10,16 a 250 µg/mL (Chaves et al., 2011; Jovito, 2016; Lima, 2016), essa diferença nas concentrações pode ser atribuída a fatores como época da coleta das plantas e pelo modo de extração que pode interferir nos compostos secundários e fitoconstituintes responsáveis pela ação antimicrobiana (Lima, 2016).

Para os testes microbiológicos, a nistatina foi o antifúngico escolhido por ser o produto mais utilizado pela população no tratamento da candidíase oral (Williams & Lewis, 2011). Além disso, esse agente antifúngico apresenta resultados comprovados de ação contra *Candida* spp. por apresentar mecanismo de ação relacionado à alteração da permeabilidade da membrana das células fúngicas (Dorocka-Bobkowska, Konopka, & Düzgüneş, 2003). Neste sentido, a nistatina se liga avidamente ao ergosterol na membrana citoplasmática fúngica, formando canais que permitem que  $K^+$  e  $Mg^{2+}$  vazem para fora da célula, causando alterações na permeabilidade celular e morte celular (Dorocka-Bobkowska et al., 2003).

A morfologia típica das fibras fiadas por sopro da solução foi observada para todas as composições testadas. Isso está relacionado às propriedades viscoelásticas do polímero e ao seu comportamento em solução na qual cadeias emaranhadas são desenhadas para formar fibras à medida que o jato se move em direção ao coletor e o solvente evapora simultaneamente (Oliveira et al., 2011).

A análise dos resultados do diâmetro das fibras indica que a adição do extrato da *S. brasiliensis* produziu fibras menos espessas quando comparadas às fibras de PLA/PEG. Essa diminuição foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando para todos os grupos quando comparado com o controle sem extrato (Figura 2), exceto para o PLA/PEG/Bra 625 que apresentou semelhança com o controle e diferença com os outros grupos. No processo SBS, três fatores contribuem ativamente para a morfologia final da fibra, incluindo concentração da solução de polímero, pressão do ar e taxa de alimentação (Oliveira et al., 2011). Como a taxa e a pressão de injeção foram mantidas constantes durante a fiação para todas as amostras, a variável mais significativa foi a composição da solução, com a adição do extrato em diferentes concentrações, resultando na modificação das propriedades viscoelásticas das soluções poliméricas. O alongamento da solução de polímero para formar fibras pode ser difícil, menos eficiente e menos estável quando são utilizadas soluções poliméricas viscosas. Soluções poliméricas viscosas e misturas de polímeros com baixa compatibilidade podem produzir fibras com uma maior variabilidade de diâmetro (Oliveira, Medeiros, et al., 2013;

Oliveira, Moraes, et al., 2013). Nenhuma separação de fase visível foi observada, o que pode ser explicado pelo curto período de tempo do processo SBS, no qual a separação de fases é reduzida, mantendo as cadeias PLA e PEG emaranhadas devido ao curto tempo de centrifugação e à rápida evaporação do solvente.

Nos ensaios de termogravimetria (TG) foi possível observar o ponto em que todos os eventos térmicos de perda de massa ocorreram, uma vez que, tanto o PLA/PEG quanto as moléculas do extrato de *S. brasiliensis* sofreram decomposição térmica. O extrato apresentou quatro etapas de decomposição, ao passo que as nanofibras apresentaram duas etapas evidentes. As nanofibras incorporadas com o extrato de *S. brasiliensis* apresentaram maior estabilidade térmica, com destaque para a PLA/PEG/Bra 2500, que apresentou maior estabilidade.

As fibras de PLA/PEG com e sem extrato, apresentaram dois eventos térmicos, o primeiro e mais pronunciado, em torno da temperatura de 314,84 °C, indicando o início da decomposição. Neste estágio, ocorreu uma perda de massa acima de 65%, referente principalmente à decomposição do constituinte majoritário, isto é, do PLA. O segundo evento térmico encontrado, com temperatura de início acima de 349 °C, podendo estar relacionado à decomposição do segundo componente da blenda, o PEG, cujo processo de decomposição ( $T_{onset}$ ) fora descrito como sendo em torno de 335 °C (Ferreira, 2017). As fibras de PLA/PEG/Bra apresentam perdas de massa com dois estágios. O primeiro evento está associado com sobreposição do pico referente ao início da decomposição do PLA com o pico de decomposição do extrato da *S. brasiliensis* ( $T_{onset I}$  do PLA 290 °C e o  $T_{onset II}$  de *S. brasiliensis* em 211,40 °C) e o segundo evento pode estar ligado à sobreposição do pico da curva de TG do PEG com o próximo evento do extrato ( $T_{onset II}$  do PEG 359,81 °C e o  $T_{onset III}$  de *S. brasiliensis* em 292,61 °C) (Fernandes, 2014; Ferreira, 2017). Observa-se que a incorporação à blenda de PLA/PEG, no modelo de nanofibras, promoveu maior estabilidade térmica ao extrato de *S. brasiliensis*, o que pode favorecer seu uso como dispositivos de liberação controlada do extrato para aplicações médico-odontológicas.

A análise de FTIR demonstrou a presença de grupos químicos compatíveis com as assinaturas dos polímeros quando em formação de blenda, 70% PLA e 30% PEG, independente da adição de extratos de *S. brasiliensis*, conforme descrito na literatura (Chieng, Ibrahim, Yunus, & Hussein, 2014; Ferreira, 2017). Define-se que números de onda 1748, 1184 e 1080  $\text{cm}^{-1}$  sejam relativos ao estiramento do grupo carbonila (C=O), ao modo vibracional axial assimétrico e angular axial do (C-O + CH<sub>3</sub>) e ao modo axial simétrico do grupo éter (C-O-C). Já os comprimentos de onda em 1452  $\text{cm}^{-1}$  e 1365  $\text{cm}^{-1}$  são

correspondentes às flexões do grupo (CH<sub>2</sub>) e deformações referentes ao (CH<sub>3</sub>). A faixa compreendida entre 3694 cm<sup>-1</sup> – 3292 cm<sup>-1</sup>, referente às hidroxilas terminais relacionadas as pontes de hidrogênio (-OH), característicos do PEG. Assim como uma banda intensa em 2886 cm<sup>-1</sup> do estiramento do (CH).

Para a determinação da presença do extrato de *S. brasiliensis* nas nanofibras, foi adotado o espectro do ácido gálico como marcador padrão. Os polifenóis representam cerca de 15% do total de compostos isolados dos extratos de *S. brasiliensis* (Fernandes et al., 2015), sendo o ácido gálico e seus derivados, aqueles que se apresentam como o principal grupo de polifenóis encontrados (dos Reis Luz et al., 2018; Fernandes et al., 2015). Neste sentido, a detecção dos números de onda específicos do marcador padrão nas amostras de nanofibras contendo os extratos da planta foram considerados sugestivos da presença do ácido gálico, e por sua vez, do extrato da planta em si. Os valores de 2926 cm<sup>-1</sup> (estiramento C–H do anel aromático), 1713 cm<sup>-1</sup> (estiramento dos ácidos carboxílicos C=O) e 1265 cm<sup>-1</sup> (estiramento do grupo C–O do éster aromático) estão de acordo com o descrito na literatura para o ácido gálico (Hirun, Dokmaisrijan, Tantishaiyakul, 2012; Lam et al., 2012), enquanto que outros números de onda mostraram sobrepostos aos de PLA ou de PEG, impossibilitando a demarcação no espectro.

O ensaio da cinética de inibição determinou a influência do tempo de exposição das soluções no processo de morte celular fúngica. As concentrações dos extratos incorporados às nanofibras foram ajustados multiplicando 10 vezes os valores das concentrações de CIM/2, CIM, CIM x 2, CIM x 4 (Tabela 2) obtidos nos ensaios antimicrobianos de determinação da concentração inibitória mínima. Isso se justifica por alguns estudos afirmarem que a concentração de substâncias para atividade anti-biofilme que se torna eficaz para ser usada para agentes antimicrobianos seria 10 a 1000 vezes maior que a CIM em meios líquidos convencionais em células planctônicas (Rochelle et al., 2016; Sardi et al., 2014). Neste sentido, a nanofibra PLA/PEG/Bra 2500 foi capaz de inibir todo o crescimento de células fúngicas em um período entre 12 e 24 horas de incubação (Figura 5), além de uma redução significativa (p<0,01) do crescimento quando comparado ao controle de crescimento no período de 4 horas, demonstrando atividade fungicida semelhante ao do fármaco livre no meio (Nistatina) na CIM. Esse efeito fungicida encontrado com o uso da nanofibra PLA/PEG/Bra, provavelmente ocorreu devido à liberação de doses constantes do extrato por um maior período de tempo, o que levou a morte celular. Ensaio microbiológicos de extratos da *S. brasiliensis* têm demonstrado que seu mecanismo de ação seria atuando na



permeabilidade iônica da membrana celular fúngica, causando subsequentemente a morte celular direta (Lima, 2016).

Efeitos anti-*Candida* da ação de nanomateriais na cinética de crescimento fúngico também foi observado em nanopartículas de quitosana (de Carvalho et al., 2019; Gondim et al., 2018), de prata (Abdehgah et al., 2017; Panáček et al., 2009), de cobre (Mudiar & Kelkar-Mane, 2018). Outros estudos, utilizando nanofibras poliméricas também demonstraram a capacidade de ação anti-*Candida* dos compostos liberados ao longo do tempo (Esentürk et al., 2020). Esses estudos são importantes pois avaliam o tempo de degradação dos polímeros em meio aquoso e o quanto que esse tempo pode influenciar no processo de controle do crescimento fúngico. Dessa forma tem-se um modelo *in vitro*, capaz de reproduzir/simular em parte, o modelo de aplicação clínica de uma nanofibra carreando substâncias antimicrobianas. Além disso, o tempo 24 horas de teste é um tempo aceitável para se mostrar o efeito das nanofibras considerando que seu possível uso clínico teria aplicação em tempos menos de 24 h. De acordo com os resultados mostrados a diferença a partir de 4 h com a nanofibra PLA/PEG/Bra 2500 foi equivalente com o fármaco nistatina, o que sugere um tempo médio de aplicação do produto pelo paciente, *in loco*, por pelo menos 4 horas.

Ensaio *in vivo* e *in vitro* já foram realizados para avaliar a toxicidade dos extratos de casca e folhas de *S. brasiliensis*. Ensaio utilizando animais foi observado que após a administração oral do extrato na dose de 2000 mg/Kg, os animais não apresentam alterações comportamentais. Entretanto, durante o período de observação, verificaram analgesia às 2 e 4 horas após a administração do extrato (Chaves et al., 2015; Santos, 2013; Silva, 2011). Além disso, os mesmos estudos avaliaram o efeito bioquímico do extrato e verificaram alterações hepáticas e renais nos ratos testados. Ensaio utilizando extratos e frações da *S. brasiliensis* mostraram que o extrato seco e a fração clorofórmio apresentaram toxicidade contra o camarão da salmoura (CL<sub>50</sub> 428 e 313 µg/mL); que apenas o clorofórmio, hexano e acetato de etila apresentaram potencial larvicida contra o *Aedes aegypti* (CL<sub>50</sub> 345,527 e 583 µg.ml<sup>-1</sup>, respectivamente); enquanto as frações de clorofórmio e acetato de etila foram altamente tóxicas para *Biomphalaria glabrata* (CL<sub>90</sub> 68 e 73 µg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente) (Santos, 2013; Silva, 2011). Foi avaliada a toxicidade aguda do extrato produzido com as folhas da *S. brasiliensis* sobre *Artemia salina* e observaram CL<sub>50</sub> de 511,90 µg/mL e 428 µg/mL, respectivamente, sendo considerada tóxica a moderada (Meyer, Ferrigni, & Putnam, 1982; Santos, 2013; Silva et al., 2012). Foi observado que a atividade do extrato das sementes da *S. brasiliensis* se mostrou larvicida, pulpicida e a reduziu a produção de ovos pelas fêmeas de *Aedes aegypti* (Barbosa et al., 2014). Sua toxicidade no microcrustáceo

*Ceriodaphnia* foi considerada como duvidosa e apresentou citotoxicidade moderada sobre linhagens celulares de HeLa (carcinoma cervical humano) uma vez que a viabilidade celular foi maior que 50% para todas as concentrações testadas com 24h de incubação (Oliveira, 2011; Santos et al., 2014).

Sabe-se que a toxicidade de nanomateriais depende da fonte, dos processos experimentais (químicos, mecânicos ou enzimáticos) e da funcionalização de grupos químicos específicos (Jeevanandam, Barhoum, Chan, Dufresne, & Danquah, 2018). Portanto, estudos *in vitro* e *in vivo* são necessários para avaliar a biocompatibilidade das nanoesferas. Os ensaios *in vitro* são realizados inicialmente para o controle do processo de produção de biomateriais. Visam avaliar o desempenho do nanomaterial a ser usado, desde aspectos físico-químicos até fisiológicos, simulando as interações e particularidades de cada tecido (Ciapetti, Cenni, Pratelli, & Pizzoferrato, 1993). É possível medir as respostas celulares após interações com nanomateriais, avaliando a segurança ao ser humano e prever o desempenho com as reações causadas pelo uso do material em situações clínicas (Oréfica, Pereira, & Mansur, 2012; Rattier B, Hoffman A, Schoen F, 2004). Portanto, ensaios de citotoxicidade em linhagens celulares são importantes para a determinação da segurança para o uso de dispositivos nanométricos em seres humanos. Isso está de acordo com as normas e regulamentações pelas normas ISO 10993-5:2009(E) e ASTM F813-07(2012), e são desenvolvidos através de testes de contato direto entre os tipos celulares escolhidos e os materiais testados (ASTM, 2012; ISO, 2009). Diante disso, foi proposto avaliar a citocompatibilidade das nanofibras produzidas no modelo de cultivo em células VERO. Observou-se que mesmo com o aumento na concentração do extrato, as nanofibras apresentaram toxicidade comparável ao controle negativo.

## 5 Conclusões

O extrato da *S. brasiliensis* apresentou atividade antifúngica para todas as cepas testadas. A morfologia típica das fibras fiadas por sopro da solução foi observada para todas as composições testadas. A análise do diâmetro das fibras indica que a adição do extrato da *S. brasiliensis* produziu fibras menos espessas quando comparadas às fibras de PLA/PEG. As fibras PLA/PEG/Bra apresentam perda de massa também em dois estágios. Os espectros que comprovam os grupos funcionais do extrato da *S. brasiliensis*, estão relacionados aos grupos presentes do ácido gálico. A nanofibra PLA/PEG/Bra 2500 foi capaz de reduzir significativamente o crescimento fúngico a partir de 4 horas de incubação, se assemelhando

ao fármaco livre nistatina na concentração de CIM. Todas as nanofibras apresentaram-se citocompatíveis quando comparadas ao controle negativo.

### Agradecimentos

Ao Laboratório Multiusuário do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia por disponibilizar o equipamento e suporte técnico para experimentos envolvendo microscopia eletrônica. O estudo também contou com auxílio financeiro do INCT-TeraNano (CNPq 465669/2014-0) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (Bolsa de Doutorado).

### Conflito de interesses

Os autores declaram que não possuem nenhum conflito de interesses.

### Referências

- Abdehgh, I. B., Khodavandi, A., Shamsazar, A., Negahdary, M., Jafarzadeh, M., & Rahimi, G. (2017). In vitro antifungal effects of biosynthesized silver nanoparticle by *Candida albicans* against *Candida glabrata*. *Biomedical Research (India)*, 28(7), 2870–2876. Retrieved from <https://www.alliedacademies.org/articles/in-vitro-antifungal-effects-of-biosynthesized-silver-nanoparticle-by-candida-albicans-against-candida-glabrata.html>
- Aldrich, A., Kuss, M. A., Duan, B., & Kielian, T. (2019). 3D Bioprinted Scaffolds Containing Viable Macrophages and Antibiotics Promote Clearance of *Staphylococcus aureus* Craniotomy-Associated Biofilm Infection. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 11(13), 12298–12307. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b00264>
- Aliagiannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S., & Chinou, I. B. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(9), 4168–4170. <https://doi.org/10.1021/jf001494m>
- ASTM. (2012). *ASTM F813-07. Standard Practice for Direct Contact Cell Culture Evaluation of Materials for Medical Devices*.
- Barbosa, P. B. B. M., de Oliveira, J. M., Chagas, J. M., Rabelo, L. M. A., de Medeiros, G. F., Giodani, R. B., ... de Fátima de Freire Melo Ximenes, M. (2014). Evaluation of seed extracts from plants found in the Caatinga biome for the control of *Aedes aegypti*. *Parasitology Research*, 113(10), 3565–3580. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4022-6>
- Bhattarai, N., Li, Z., Gunn, J., Leung, M., Cooper, A., Edmondson, D., ... Zhang, M. (2009). Natural-synthetic polyblend nanofibers for biomedical applications. *Advanced Materials*, 21(27), 2792–2797. <https://doi.org/10.1002/adma.200802513>
- Bilbao-Sainz, C., Chiou, B. Sen, Valenzuela-Medina, D., Du, W. X., Gregorski, K. S., Williams, T. G., ... Orts, W. J. (2014). Solution blow spun poly(lactic

- acid)/hydroxypropyl methylcellulose nanofibers with antimicrobial properties. *European Polymer Journal*, 54(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.02.004>
- Bonan, R., Bonan, P., Batista, A., Perez, D., Castellano, L., Oliveira, J., & Medeiros, E. (2017). Poly(lactic acid)/poly(vinyl pyrrolidone) membranes produced by solution blow spinning: Structure, thermal, spectroscopic, and microbial barrier properties. *Journal of Applied Polymer Science*, 134(19). <https://doi.org/10.1002/app.44802>
- Bonan, R., Bonan, P. R., Batista, A. U., Sampaio, F. C., Albuquerque, A. J., Moraes, M. C., ... Oliveira, J. E. (2015). In vitro antimicrobial activity of solution blow spun poly(lactic acid)/polyvinylpyrrolidone nanofibers loaded with Copaiba (*Copaifera* sp.) oil. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 48, 372–377. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.12.021>
- Chaves, T., Dantas, I. C., Felismino, D., Vieira, K., Clementino, E., & Costa, L. S. (2011). Atividade antimicrobiana das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engler. *Revista de Biologia e Farmácia*, 5, 11–17.
- Chaves, T. P., Barbosa, A. S., Nunes, L. E., Silva, K. M., Simões, M. O. S., Santos, R. L., Medeiros, A. C. D. (2015). Evaluation of the potential modulator of bacterial resistance, acute toxicity and chemical composition of *Schinopsis brasiliensis* Engl. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 9(33), 843–849. <https://doi.org/10.5897/ajpp2015.4381>
- Chieng, B. W., Ibrahim, N. A., Yunus, W. M. Z. W., & Hussein, M. Z. (2014). Poly(lactic acid)/poly(ethylene glycol) polymer nanocomposites: Effects of graphene nanoplatelets. *Polymers*, 6(1), 93–104. <https://doi.org/10.3390/polym6010093>
- Ciapetti, G., Cenni, E., Pratelli, L., & Pizzoferrato, A. (1993). In vitro evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay. *Biomaterials*, 14(5), 359–364. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(93\)90055-7](https://doi.org/10.1016/0142-9612(93)90055-7)
- CLSI. (2008). *Clinical and Laboratory Standards Institute. Antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals*. Wayne, PA. Retrieved from [www.clsi.org](http://www.clsi.org).
- Cowan, M. M. (1999, October). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. Clin Microbiol Rev. <https://doi.org/10.1128/cmr.12.4.564>
- de Carvalho, F. G., Magalhães, T. C., Teixeira, N. M., Gondim, B. L. C., Carlo, H. L., dos Santos, R. L., ... Denadai, Â. M. L. (2019). Synthesis and characterization of TPP/chitosan nanoparticles: Colloidal mechanism of reaction and antifungal effect on *C. albicans* biofilm formation. *Materials Science and Engineering C*, 104. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109885>
- de Sousa Araújo, T. A., Alencar, N. L., de Amorim, E. L. C., & de Albuquerque, U. P. (2008). A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. *Journal of Ethnopharmacology*, 120(1), 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.07.032>
- Dorocka-Bobkowska, B., Konopka, K., & Düzgüneş, N. (2003). Influence of antifungal polyenes on the adhesion of *Candida albicans* and *Candida glabrata* to human epithelial cells in vitro. *Archives of Oral Biology*, 48(12), 805–814. [https://doi.org/10.1016/S0003-9969\(03\)00174-2](https://doi.org/10.1016/S0003-9969(03)00174-2)

- dos Reis Luz, L., Porto, D. D., Castro, C. B., Silva, M. F. S., de Godoy Alves Filho, E., Canuto, K. M., ... Zocolo, G. J. (2018). Metabolomic profile of *Schinopsis brasiliensis* via UPLC-QTOF-MS for identification of biomarkers and evaluation of its cytotoxic potential. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1099, 97–109. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.09.019>
- Dumitriu, C., Stoian, A. B., Titorencu, I., Pruna, V., Jinga, V. V., Latonen, R. M., ... Demetrescu, I. (2014). Electrospun TiO<sub>2</sub> nanofibers decorated Ti substrate for biomedical application. *Materials Science and Engineering C*, 45, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.08.055>
- Esentürk, İ., Balkan, T., Özhan, G., Döşler, S., Güngör, S., Erdal, M. S., & Sarac, A. S. (2020). Voriconazole incorporated nanofiber formulations for topical application: preparation, characterization and antifungal activity studies against *Candida* species. *Pharmaceutical Development and Technology*, 25(4), 440–453. <https://doi.org/10.1080/10837450.2019.1706563>
- Evanjelene, V. K. (2012). In Vitro Antioxidant and Phytochemical Analysis of *Acalypha alnifolia* Klein Ex Willd. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 1(5), 43–47. <https://doi.org/10.9790/3008-0154347>
- Fernandes, F. H. A. (2014). *Desenvolvimento de forma farmacêutica sólida obtida a partir de extrato seco de Schinopsis brasiliensis ENGLER*. Universidade Estadual da Paraíba.
- Fernandes, F. H. A., de Batista, R. S. A., de Medeiros, F. D., Santos, F. S., & Medeiros, A. C. D. (2015). Development of a rapid and simple HPLC-UV method for determination of gallic acid in *Schinopsis brasiliensis*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 25(3), 208–211. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.05.006>
- Ferreira, K. do N. (2017). *Estudo Da Liberação Controlada De Sinvastatina Utilizando Nanofibras De Pla / Peg Produzidas Por Utilizando Nanofibras De Pla / Peg Produzidas Por Fiação Por Sopro Em Solução*. Universidade Federal da Paraíba. Retrieved from <https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/123456789/14247>
- Formiga Filho, A. L. N., Carneiro, V. S. M., Souza, E. A., Santos, R. L., Cataõ, M. H. C. V., & Medeiros, A. C. D. (2015). In vitro evaluation of antimicrobial photodynamic therapy associated with hydroalcoholic extracts of *schinopsis brasiliensis engl.*: New therapeutic perspectives. *Photomedicine and Laser Surgery*, 33(5), 240–245. <https://doi.org/10.1089/pho.2014.3796>
- Freires, I. de A., Murata, R. M., Furletti, V. F., Sartoratto, A., De Alencar, S. M., Figueira, G. M., ... Rosalen, P. L. (2014). *Coriandrum sativum* L. (Coriander) essential oil: Antifungal activity and mode of action on *Candida* spp., and molecular targets affected in human whole-genome expression. *PLoS ONE*, 9(6), e99086. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099086>
- Gad, M. M., & Fouda, S. M. (2020, March 31). Current perspectives and the future of *Candida albicans*-associated denture stomatitis treatment. *Dental and Medical Problems*. <https://doi.org/10.17219/dmp/112861>
- Gondim, B., Castellano, L., Castro, R., Machado, G., Carlo, H., Valença, M., & de Carvalho, F. (2018). Effect of chitosan nanoparticles on the inhibition of *Candida* spp. biofilm on denture base surface. *Archives of Oral Biology*, 94, 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.07.004>

- Gondim, B., Oshiro-Júnior, J., Fernanandes, F., Nóbrega, F., Castellano, L., & Medeiros, A. (2019). Plant Extracts Loaded in Nanostructured Drug Delivery Systems for Treating Parasitic and Antimicrobial Diseases. *Current Pharmaceutical Design*, 25(14), 1604–1615. <https://doi.org/10.2174/1381612825666190628153755>
- Han, J., Zhao, D., Li, D., Wang, X., Jin, Z., & Zhao, K. (2018). Polymer-based nanomaterials and applications for vaccines and drugs. *Polymers*, 10(1), 1–14. <https://doi.org/10.3390/polym10010031>
- Hirun, N., Dokmaisrijan, S., & Tantishaiyakul, V. (2012). Experimental FTIR and theoretical studies of gallic acid-acetonitrile clusters. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 86, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2011.10.009>
- ISO. (2009). *ISO 10993-5:2009. Biological evaluation of medical devices - Part 5: tests for in vitro cytotoxicity*. Geneva.
- Ivanova, E. P., Bazaka, K., & Crawford, R. J. (2014). Advanced synthetic polymer biomaterials derived from organic sources. In *New Functional Biomaterials for Medicine and Healthcare* (pp. 71–99). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9781782422662.71>
- Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y. S., Dufresne, A., & Danquah, M. K. (2018). Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations. *Beilstein Journal of Nanotechnology*. Beilstein-Institut. <https://doi.org/10.3762/bjnano.9.98>
- Jovito, V. C. (2016). *Atividades anti-Candida e análise da citotoxicidade do extrato da folha da Schinopsis brasiliensis Engl.* Dissertação, (Mestrado em Odontologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.
- Kamyar, N., Greenhalgh, R. D., Nascimento, T. R. L., Medeiros, E. S., Matthews, P. D., Nogueira, L. P., ... Blaker, J. J. (2018). Exploiting Inherent Instability of 2D Black Phosphorus for Controlled Phosphate Release from Blow-Spun Poly(lactide-co-glycolide) Nanofibers. *ACS Applied Nano Materials*, 1(8), 4190–4197. <https://doi.org/10.1021/acsnm.8b00938>
- Lam, P. L., Lee, K. K. H., Kok, S. H. L., Cheng, G. Y. M., Tao, X. M., Hau, D. K. P., ... Wong, R. S. M. (2012). Development of formaldehyde-free agar/gelatin microcapsules containing berberine HCl and gallic acid and their topical and oral applications. *Soft Matter*, 8(18), 5027–5037. <https://doi.org/10.1039/c2sm07236j>
- Lima, M. M. S. M. (2016). *Atividade antifúngica e modo de ação do extrato etanólico da folha de Schinopsis brasiliensis Engl. sobre espécies do gênero Candida*. Universidade Estadual da Paraíba.
- Liu, Y., Hu, T., Wu, Z., Zeng, G., Huang, D., Shen, Y., ... He, Y. (2014). Study on biodegradation process of lignin by FTIR and DSC. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(24), 14004–14013. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3342-5>
- Louis, K. S., & Siegel, A. C. (2011). Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. In M. Stoddart (Ed.), *Mammalian Cell Viability. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)* (1st ed., Vol. 740, pp. 7–12). Clifton: Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6_2)
- Lutz, J. F., & Hoth, A. (2006). Preparation of ideal PEG analogues with a tunable

- thermosensitivity by controlled radical copolymerization of 2-(2-methoxyethoxy)ethyl methacrylate and oligo(ethylene glycol) methacrylate. *Macromolecules*, *39*(2), 893–896. <https://doi.org/10.1021/ma0517042>
- Marcos-Arias, C., Eraso, E., Madariaga, L., & Quindós, G. (2011). In vitro activities of natural products against oral *Candida* isolates from denture wearers. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *11*, 119. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-11-119>
- Marra, J., Paleari, A. G., Rodriguez, L. S., Leite, A. R. P., Pero, A. C., & Compagnoni, M. A. (2012). Effect of an acrylic resin combined with an antimicrobial polymer on biofilm formation. *Journal of Applied Oral Science*, *20*(6), 643–648. <https://doi.org/10.1590/S1678-77572012000600009>
- Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, *4*(2), 119–128. <https://doi.org/10.4161/viru.22913>
- Medeiros, E. S., Glenn, G. M., Klamczynski, A. P., Orts, W. J., & Mattoso, L. H. C. (2009). Solution blow spinning: A new method to produce micro- and nanofibers from polymer solutions. *Journal of Applied Polymer Science*, *113*(4), 2322–2330. <https://doi.org/10.1002/app.30275>
- Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., & Putnam, J. E. (1982). Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, *45*(1), 31–34. <https://doi.org/10.1055/s-2007-971236>
- Mudiar, R., & Kelkar-Mane, V. (2018). Targeting fungal menace through copper nanoparticles and Tamrajal. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.jaim.2018.02.134>
- Ni, P. Y., Ding, Q. X., Fan, M., Liao, J. F., Qian, Z. Y., Luo, J. C., ... Wei, Y. Q. (2014). Injectable thermosensitive PEG-PCL-PEG hydrogel/acellular bone matrix composite for bone regeneration in cranial defects. *Biomaterials*, *35*(1), 236–248. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.10.016>
- Oliveira, A. M. G. C. (2011). *Avaliação da atividade antimalárica e citotóxica de plantas medicinais dos Biomas Caatinga e Amazônico*. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade; Biologia Estrutural e Funcional.) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.
- Oliveira, J. E., Medeiros, E., Cardozo, L., Voll, F., Madureira, E., Mattoso, L., & Assis, O. (2013). Development of poly(lactic acid) nanostructured membranes for the controlled delivery of progesterone to livestock animals. *Materials Science and Engineering C*, *33*(2), 844–849. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.10.032>
- Oliveira, J. E., Moraes, E., Costa, R., Afonso, A., Mattoso, L., Orts, W., & Medeiros, E. (2011). Nano and submicrometric fibers of poly(D, L -lactide) obtained by solution blow spinning: Process and solution variables. *Journal of Applied Polymer Science*, *122*(5), 3396–3405. <https://doi.org/10.1002/app.34410>
- Oliveira, J. E., Moraes, E., Marconcini, J., Mattoso, L., Glenn, G., & Medeiros, E. (2013). Properties of poly(lactic acid) and poly(ethylene oxide) solvent polymer mixtures and nanofibers made by solution blow spinning. *Journal of Applied Polymer Science*, *129*(6), 3672–3681. <https://doi.org/10.1002/app.39061>

- Oliveira, J., Mattoso, L. H., Orts, W. J., & Medeiros, E. S. (2013). Structural and morphological characterization of micro and nanofibers produced by electrospinning and solution blow spinning: A comparative study. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2013, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2013/409572>
- Oréface, R. L., Pereira, M. de M., & Mansur, H. S. (2012). *Biomateriais: Fundamentos e Aplicações*. (G. Koogan, Ed.) (II). Rio de Janeiro - RJ: Cultura Médica.
- Panáček, A., Kolář, M., Večeřová, R., Pucek, R., Soukupová, J., Kryštof, V., ... Kvítek, L. (2009). Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials*, 30(31), 6333–6340. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.065>
- Paranhos, H. F. O., Bezzon, O. L., Davi, L. R., Felipucci, D. N. B., Silva, C. H. L., & Pagnano, V. O. (2014). Effect of cleanser solutions on the color of acrylic resins associated with titanium and nickel-chromium alloys. *Brazilian Oral Research*, 28(1), 1–7. <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2014.vol28.0017>
- Pelipenko, J., Kocbek, P., & Kristl, J. (2015). Critical attributes of nanofibers: Preparation, drug loading, and tissue regeneration. *International Journal of Pharmaceutics*, 484(1–2), 57–74. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.02.043>
- Rattier B, Hoffman A, Schoen F, L. J. (2004). *Biomaterials Science. An Introduction to Materials in Medicine*. (B. D. Ratner, Ed.) (2nd ed.). London: Elsevier Academic Press.
- Rezaei, B., Ghani, M., Shoushtari, A. M., & Rabiee, M. (2016). Electrochemical biosensors based on nanofibres for cardiac biomarker detection: A comprehensive review. *Biosensors and Bioelectronics*, 78, 513–523. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.11.083>
- Rochelle, S. L. de A., Sardi, J. de C. O., Freires, I. A., Galvão, L. C. de C., Lazarini, J. G., de Alencar, S. M., & Rosalen, P. L. (2016). The anti-biofilm potential of commonly discarded agro-industrial residues against opportunistic pathogens. *Industrial Crops and Products*, 87, 150–160. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.03.044>
- Santos, C. C. S., Araújo, S. S., Santos, A. L. L. M., Almeida, E. C. V, Dias, A. S., Damascena, N. P., ... Araujo, B. S. (2014). Evaluation of the toxicity and molluscicidal and larvicidal activities of *Schinopsis brasiliensis* stem bark extract and its fractions. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 24(3), 298–303. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.07.006>
- Santos, R. L. (2013). *Desenvolvimento de um dentifrício a partir de extrato nebulizado de Schinopsis brasiliensis Engler*. Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande.
- Santos, V., Viera, P., Oliveira, A., Zanin, M., & Borsatti, M. (2014). Antifungal effect of electrospun nanofibers containing cetylpyridinium chloride against *Candida albicans*. *Brazilian Oral Research*, 28(1), 1–6.
- Saraiva, A. M., Saraiva, C. L., Cordeiro, R. P., Soares, R. R., Xavier, H. S., & Caetano, N. (2013). Atividade antimicrobiana e sinérgica das frações das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engl. frente a clones multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 15(2), 199–207. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722013000200006>
- Sardi, J. D. C. O., Pitangui, N. D. S., Rodríguez-Arellanes, G., Taylor, M. L., Fusco-Almeida, A. M., & Mendes-Giannini, M. J. S. (2014). Highlights in pathogenic fungal biofilms. *Revista Iberoamericana de Micología. Rev Iberoam Micol.* <https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.09.014>



- Silva, M. S. P. (2011). *Ensaio pré-clínico com extratos de plantas medicinais do semi-árido nordestino: contribuição para o tratamento de infecções da cavidade bucal*. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia e Promoção de Saúde) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande.
- Silva, M. S. P., Brando, D. O., Chaves, T. P., Formiga Filho, A. L. N., Costa, E. M. M. B., Santos, V. L., & Medeiros, A. C. D. (2012). Study bioprospecting of medicinal plant extracts of the semiarid northeast: Contribution to the control of oral microorganisms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2012/681207>
- Simona, A. D., Florina, A., Rodica, C. A., Evelyne, O., & Maria-Corina, S. (2017). Nanoscale Delivery Systems: Actual and Potential Applications in the Natural Products Industry. *Current Pharmaceutical Design*, 23(17), 2414–2421. <https://doi.org/10.2174/1381612823666170220155540>
- Vasita, R., & Katti, D. S. (2019). Nanofibers and their applications in tissue engineering Methods for nanofiber synthesis. *International Journal of Nanomedicine*, 1(1), 15–30.
- Wady, A. F., Machado, A. L., Zucolotto, V., Zamperini, C. A., Berni, E., & Vergani, C. E. (2012). Evaluation of *Candida albicans* adhesion and biofilm formation on a denture base acrylic resin containing silver nanoparticles. *Journal of Applied Microbiology*, 112(6), 1163–1172. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05293.x>
- Wang, F., Sun, Z., Yin, J., & Xu, L. (2019). Preparation, characterization and properties of porous PLA/PEG/curcumin composite Nanofibers for antibacterial application. *Nanomaterials*, 9(4), 508. <https://doi.org/10.3390/nano9040508>
- Williams, D., & Lewis, M. (2011, January 28). Pathogenesis and treatment of oral candidosis. *Journal of Oral Microbiology*. Taylor & Francis. <https://doi.org/10.3402/jom.v3i0.5771>
- Xu, F., Cui, F. Z., Jiao, Y. P., Meng, Q. Y., Wang, X. P., & Cui, X. Y. (2009). Improvement of cytocompatibility of electrospinning PLLA microfibers by blending PVP. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20(6), 1331–1338. <https://doi.org/10.1007/s10856-008-3686-9>
- Yildirim-Bicer, A. Z., Peker, I., Akca, G., & Celik, I. (2014). In vitro antifungal evaluation of seven different disinfectants on acrylic resins. *BioMed Research International*, 2014, 519098. <https://doi.org/10.1155/2014/519098>
- Zander, Z. K., Hua, G., Wiener, C. G., Vogt, B. D., & Becker, M. L. (2015). Control of Mesh Size and Modulus by Kinetically Dependent Cross-Linking in Hydrogels. *Advanced Materials*, 27(40), 6283–6288. <https://doi.org/10.1002/adma.201501822>

# CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. A CIM88,8% do extrato de *S. brasiliensis* capaz de inibir 88,8% das cepas estudadas foi de 62,5 µg/mL. A relação CFM/CIM revelou uma atividade fungicida do composto estudado para todas as cepas.
2. A morfologia típica das fibras fiadas por sopro da solução foi observada para todas as composições testadas. Entretanto, a análise do diâmetro das fibras indica que a adição do extrato da *S. brasiliensis* produziu fibras menos espessas quando comparadas às fibras de PLA/PEG, exceto para a PLA/PRG/Bra 625.
3. As fibras PLA/PEG/Bra apresentam perda de massa também em dois estágios. O primeiro em torno da temperatura de 290° C e o segundo evento encontrado, com temperatura início acima de 370° C.
4. Os espectros que comprovam os grupos funcionais do extrato da *S. brasiliensis*, estão relacionados aos grupos presentes do ácido 2926 cm<sup>-1</sup>, 1713 cm<sup>-1</sup> e 1265 cm<sup>-1</sup>.
5. A nanofibra PLA/PEG/Bra a uma concentração de 2,5 mg/mL foi capaz de reduzir significativamente o crescimento fúngico a partir de 4 horas de incubação, se assemelhando ao fármaco livre nistatina na concentração de CIMx4.
6. Com relação a determinação de citocompatibilidade, todas as nanofibras apresentaram toxicidade comparável ao controle negativo. Não foram observadas diferenças entre os grupos de nanofibras com ou sem o extrato.

# REFERÊNCIAS

---

## 6 REFERÊNCIAS

- AGHAZADEH, MARZIEH *et al.* Survey of the antibiofilm and antimicrobial effects of *Zingiber officinale* (In vitro study). **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 9, n. 2, 7 fev. 2016.
- AHMAD, N.; JAFRI, Z.; KHAN, Z. H. Evaluation of nanomaterials to prevent oral Candidiasis in PMMA based denture wearing patients. A systematic analysis. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 10, n. 2, p. 189–193, 2020.
- ALBUQUERQUE, U. P. Re-examining hypotheses concerning the use and knowledge of medicinal plants: A study in the Caatinga vegetation of NE Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 2, p. 30, 2006.
- \_\_\_\_\_. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p. 325–354, dez. 2007.
- ALMEIDA, C. F. C. B. R. *et al.* Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the caatinga (Northeast Brazil). **Journal of Arid Environments**, v. 62, n. 1, p. 127–142, 1 jul. 2005.
- ALWATTAR, A. *et al.* Synthesis and characterisation of fluorescent pyrene-end-capped polylactide fibres. **Polymer International**, v. 68, n. 3, p. 360–368, 1 mar. 2019.
- AMIN, F.; REHMAN, A.; ABBAS, M. Microhardness of heat cure acrylic resin after treatment with disinfectants. **Journal of the Pakistan Medical Association**, v. 65, n. 8, p. 834–837, 2015.
- ASTM. **ASTM F813-07. Standard Practice for Direct Contact Cell Culture Evaluation of Materials for Medical Devices**. [s.l.: s.n.].
- ASVADI, N. H. *et al.* Evaluation of microporous polycaprolactone matrices for controlled delivery of antiviral microbicides to the female genital tract. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 24, n. 12, p. 2719–2727, 28 dez. 2013.
- BAKSHI, M. *et al.* **Comparison of therapeutic effect of aqueous extract of garlic and nystatin mouthwash in denture stomatitis** *Gerodontology*, jun. 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1741-2358.2011.00544.x>>. Acesso em: 17 maio. 2020
- BARBOSA, P. B. B. M. *et al.* Evaluation of seed extracts from plants found in the Caatinga biome for the control of *Aedes aegypti*. **Parasitology Research**, v. 113, n. 10, p. 3565–3580, 24 out. 2014.
- BATISH, D. R. *et al.* Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. **Forest Ecology and Management**, v. 256, n. 12, p. 2166–2174, 10 dez. 2008.
- BHATTARAI, N. *et al.* Natural-synthetic polyblend nanofibers for biomedical applications. **Advanced Materials**, v. 21, n. 27, p. 2792–2797, 20 jul. 2009.
- BILBAO-SAINZ, C. *et al.* Solution blow spun poly(lactic acid)/hydroxypropyl methylcellulose nanofibers with antimicrobial properties. **European Polymer Journal**, v.

54, n. 1, p. 1–10, 1 maio 2014.

BONAN, R. *et al.* In vitro antimicrobial activity of solution blow spun poly(lactic acid)/polyvinylpyrrolidone nanofibers loaded with Copaiba (*Copaifera* sp.) oil. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 48, p. 372–377, 2015.

\_\_\_\_\_. Poly(lactic acid)/poly(vinyl pyrrolidone) membranes produced by solution blow spinning: Structure, thermal, spectroscopic, and microbial barrier properties. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 134, n. 19, 15 maio 2017.

BORASCHI, D.; CASTELLANO, L. R. C.; ITALIANI, P. Editorial: Interaction of Nanomaterials with the Immune System: Role in Nanosafety and Nanomedicine. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1688, 28 nov. 2017.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos** (Ministério da Saúde, Ed.) **Brasília: Ministério da Saúde**. Brasília-DF: [s.n.]. Disponível em: <[www.saude.gov.br/bvs](http://www.saude.gov.br/bvs)>. Acesso em: 23 mar. 2020.

CABRINI CARMELLO, J. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy reduces adhesion capacity and biofilm formation of *Candida albicans* from induced oral candidiasis in mice. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 27, p. 402–407, set. 2019.

CHAPMAN, B. *et al.* Changing epidemiology of candidaemia in Australia. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 4, p. 1103–1108, 2017.

CHAVES, T. P. *et al.* Evaluation of the potential modulator of bacterial resistance, acute toxicity and chemical composition of *Schinopsis brasiliensis* Engl. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 9, n. 33, p. 843–849, 8 set. 2015.

CHINATANGKUL, N. *et al.* Design and characterization of monolaurin loaded electrospun shellac nanofibers with antimicrobial activity. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 5, p. 459–471, 1 set. 2018.

CHINSEMBU, K. C. **Plants and other natural products used in the management of oral infections and improvement of oral health** *Acta Tropica* *Acta Trop*, , fev. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26522671>>. Acesso em: 10 jun. 2020

CLSI. **Clinical and Laboratory Standards Institute. Antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals**. Wayne, PA: [s.n.]. Disponível em: <[www.clsi.org](http://www.clsi.org)>. Acesso em: 11 jun. 2020.

CORONADO-CASTELLOTE, L.; JIMÉNEZ-SORIANO, Y. Clinical and microbiological diagnosis of oral candidiasis. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, v. 5, n. 5, p. 279–286, 1 dez. 2013.

CORRADINI, E. *et al.* **Flavonoids: Chemical properties and analytical methodologies of identification and quantitation in foods and plants** *Natural Product Research* Taylor & Francis Group, , mar. 2011. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14786419.2010.482054>>. Acesso em: 17 maio. 2020

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670–

3695, jun. 2013.

DAVIES, A. *et al.* Cationic porphyrin-mediated photodynamic inactivation of *Candida* biofilms and the effect of miconazole. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 67, n. 5, p. 777–783, 2016.

DONATI, M. *et al.* Radical scavenging and antimicrobial activities of *Croton zehntneri*, *Pterodon emarginatus* and *Schinopsis brasiliensis* essential oils and their major constituents: Estragole, trans -anethole,  $\beta$ -caryophyllene and myrcene. **Natural Product Research**, v. 29, n. 10, p. 939–946, 19 maio 2015.

ESENTÜRK, İ. *et al.* Voriconazole incorporated nanofiber formulations for topical application: preparation, characterization and antifungal activity studies against *Candida* species. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 25, n. 4, p. 440–453, 20 abr. 2020.

FATHI-AZARBAYJANI, A.; CHAN, S. Y. Single and multi-layered nanofibers for rapid and controlled drug delivery. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 58, n. 2, p. 143–146, fev. 2010.

FERNANDES, F. H. A. *et al.* **Thermal characterization of dried extract of medicinal plant by DSC and analytical techniques** *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. **Anais...Springer**, 12 ago. 2013 Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10973-012-2807-3>>. Acesso em: 17 maio. 2020

FERNANDES, F. H. A. *et al.* Development of a rapid and simple HPLC-UV method for determination of gallic acid in *Schinopsis brasiliensis*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, n. 3, p. 208–211, maio 2015.

FERNANDES, F. H. A. *et al.* Evaluation of compatibility between *Schinopsis brasiliensis* Engler extract and pharmaceutical excipients using analytical techniques associated with chemometric tools. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 123, n. 3, p. 2531–2542, 30 mar. 2016.

FERREIRA, G. L. S. *et al.* **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* *Evid Based Complement Alternat Med*, , 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25883668>>. Acesso em: 10 jun. 2020

FINKEL, J. S.; MITCHELL, A. P. **Genetic control of *Candida albicans* biofilm development** *Nature Reviews Microbiology*, fev. 2011. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrmicro2475>>. Acesso em: 17 maio. 2020

FORMIGA FILHO, A. L. N. *et al.* In vitro evaluation of antimicrobial photodynamic therapy associated with hydroalcoholic extracts of *schinopsis brasiliensis* engl.: New therapeutic perspectives. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 33, n. 5, p. 240–245, maio 2015.

FREIRES, I. DE A. *et al.* *Coriandrum sativum* L. (Coriander) essential oil: Antifungal activity and mode of action on *Candida* spp., and molecular targets affected in human whole-genome expression. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. e99086, 2014.

GAD, M. M.; FOUUDA, S. M. **Current perspectives and the future of *Candida albicans*-associated denture stomatitis treatment** *Dental and medical problems*, 31 mar. 2020.

Disponível em: <<http://www.dmp.umed.wroc.pl/pdf/2020/57/1/95.pdf>>. Acesso em: 17 maio. 2020

GEBREMEDHIN, S. *et al.* Miconazole activity against *Candida* biofilms developed on acrylic discs. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 65, n. 4, p. 593–600, 2014.

GENDREAU, L.; LOEWY, Z. G. Epidemiology and Etiology of Denture Stomatitis. **Journal of Prosthodontics**, v. 20, n. 4, p. 251–260, jun. 2011.

GHOLIZADEH, P. *et al.* Role of oral microbiome on oral cancers, a review. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 84, p. 552–558, dez. 2016.

GONDIM, B. *et al.* Effect of chitosan nanoparticles on the inhibition of *Candida* spp. biofilm on denture base surface. **Archives of Oral Biology**, v. 94, p. 99–107, out. 2018.

\_\_\_\_\_. Plant Extracts-Loaded in Nanostructured Drug Delivery Systems as Alternatives for the Treatment of Parasitic and Antimicrobial Diseases. **Current Pharmaceutical Design**, v. 25, n. 14, p. 1604–1615, 16 ago. 2019.

GUIMARÃES, G. P. **Atividade antifúngica de plantas medicinais frente a espécies de *Candida* de interesse médico.** [s.l.] Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia)- Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2010.

GUPTA, B.; REVAGADE, N.; HILBORN, J. **Poly(lactic acid) fiber: An overview** **Progress in Polymer Science (Oxford)** Pergamon, , 1 abr. 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S007967000700007X?via%3Dihub>>. Acesso em: 17 maio. 2020

HIROTA, K. *et al.* **Pathogenic factors in *Candida* biofilm-related infectious diseases** **Journal of Applied Microbiology** *J Appl Microbiol*, , fev. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27770500>>. Acesso em: 28 jun. 2020

HU, L. *et al.* Characterization of oral candidiasis and the *Candida* species profile in patients with oral mucosal diseases. **Microbial Pathogenesis**, v. 134, p. 103575, set. 2019.

IRANI, M.; MIR MOHAMAD SADEGHI, G.; HARIRIAN, I. A novel biocompatible drug delivery system of chitosan/temozolomide nanoparticles loaded PCL-PU nanofibers for sustained delivery of temozolomide. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 97, p. 744–751, abr. 2017.

ISO. **ISO 10993-5:2009. Biological evaluation of medical devices - Part 5: tests for in vitro cytotoxicity.** Geneva: [s.n.].

IVANOVA, E. P.; BAZAKA, K.; CRAWFORD, R. J. Advanced synthetic polymer biomaterials derived from organic sources. *In: New Functional Biomaterials for Medicine and Healthcare.* [s.l.] Woodhead Publishing, 2014. p. 71–99.

JAVED, F. *et al.* Oral *Candida* carriage and species prevalence in denture stomatitis patients with and without diabetes. **J Biol Regul Homeost Agents**, v. 31, n. 2, p. 343–346, 2017.

JOVITO, V. C. **Atividades anti-*Candida* e análise da citotoxicidade do extrato da folha da *Schinopsis brasiliensis* Engl.** [s.l.] Dissertação, (Mestrado em Odontologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.

KAMYAR, N. *et al.* Exploiting Inherent Instability of 2D Black Phosphorus for Controlled Phosphate Release from Blow-Spun Poly(lactide- co-glycolide) Nanofibers. **ACS Applied**

- Nano Materials**, v. 1, n. 8, p. 4190–4197, 24 ago. 2018.
- KARCZEWSKI, A. *et al.* Clindamycin-modified Triple Antibiotic Nanofibers: A Stain-free Antimicrobial Intracanal Drug Delivery System. **Journal of Endodontics**, v. 44, n. 1, p. 155–162, jan. 2018.
- KARIMI, S. *et al.* Amphotericin-B and vancomycin-loaded chitosan nanofiber for antifungal and antibacterial application. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 55, p. 1–9, 2019.
- KAWASHITA, Y. *et al.* A retrospective study of factors associated with the development of oral candidiasis in patients receiving radiotherapy for head and neck cancer Is topical steroid therapy a risk factor for oral candidiasis? **Medicine (United States)**, v. 97, n. 44, p. e13073, nov. 2018.
- KENAWY, E. R. *et al.* Release of tetracycline hydrochloride from electrospun poly(ethylene-co-vinylacetate), poly(lactic acid), and a blend. **Journal of Controlled Release**, v. 81, n. 1–2, p. 57–64, maio 2002.
- KIM, E. J. *et al.* Preparation of biodegradable PLA/PLGA membranes with PGA mesh and their application for periodontal guided tissue regeneration. **Biomedical Materials**, v. 4, n. 5, 2009.
- KOU, L. *et al.* Biomaterial-engineered intra-articular drug delivery systems for osteoarthritis therapy. **Drug Delivery**, v. 26, n. 1, p. 870–885, dez. 2019.
- KREYLING, W. G.; SEMMLER-BEHNKE, M.; CHAUDHRY, Q. A complementary definition of nanomaterial. **Nano Today**, v. 5, n. 3, p. 165–168, 1 jun. 2010.
- KUMAR, A. *et al.* **Conundrum and therapeutic potential of curcumin in drug delivery** *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 2010. Disponível em: <<http://www.dl.begellhouse.com/journals/3667c4ae6e8fd136,51ceb58b7afcc5a4,297b013d2b7226d6.html>>. Acesso em: 17 maio. 2020
- KUN, E. Mechanism of Enzymatic Reduction of Triphenyl Tetrazolium Chloride. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 78, n. 1, p. 195–197, 1 out. 1951.
- LAVAE, F. *et al.* Antifungal effect of the bark and root extracts of Punica granatum on oral Candida isolates. **Current Medical Mycology**, v. 4, n. 4, p. 20–24, dez. 2018.
- LEMKE, A.; KIDERLEN, A. F.; KAYSER, O. **Amphotericin B** *Applied Microbiology and Biotechnology*, 9 ago. 2005. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00253-005-1955-9>>. Acesso em: 17 maio. 2020
- LI, H. *et al.* In vitro and in vivo antifungal activities and mechanism of heteropolytungstates against Candida species. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 16942, 5 dez. 2017.
- LIU, C.-X. *et al.* Drug Metabolism and Pharmacokinetics of Nanodrugs from Chinese Medicines and Natural Products. **Current Drug Metabolism**, v. 13, n. 5, p. 659–666, 1 maio 2012.
- LIU, Y. *et al.* Study on biodegradation process of lignin by FTIR and DSC. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 24, p. 14004–14013, 20 dez. 2014.

- LOUIS, K. S.; SIEGEL, A. C. Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. *In*: STODDART, M. (Ed.). **Mammalian Cell Viability. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)**. 1. ed. Clifton: Humana Press, 2011. v. 740p. 7–12.
- LU, X. *et al.* **One-dimensional conducting polymer nanocomposites: Synthesis, properties and applications** *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 2011. Disponível em: <<http://habana.qfa.uam.es/~lmc/ref/old/lu11.pdf>>. Acesso em: 17 maio. 2020
- LUTZ, J. F.; HOTH, A. Preparation of ideal PEG analogues with a tunable thermosensitivity by controlled radical copolymerization of 2-(2-methoxyethoxy)ethyl methacrylate and oligo(ethylene glycol) methacrylate. **Macromolecules**, v. 39, n. 2, p. 893–896, 2006.
- MACHADO, S. E. F. **Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos fracionados de casca e folha da Schinopsis Brasiliensis Engler. através de análise comparativa entre os métodos de difusão em disco e de cavidade em placa.** [s.l.] Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia)- Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2012.
- MADUGULA, P. “Rhetoric to Reality”- Efficacy of Punica Granatum Peel Extract on Oral Candidiasis: An In vitro Study. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, 2017.
- MÄKINEN, A. *et al.* Role of Non-Albicans Candida and Candida Albicans in Oral Squamous Cell Cancer Patients. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 76, n. 12, p. 2564–2571, 2018.
- MARCOS-ARIAS, C. *et al.* In vitro activities of natural products against oral Candida isolates from denture wearers. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, p. 119, 26 nov. 2011.
- MARTINS DE ANDRADE, V. *et al.* Antifungal and anti-biofilm activity of designed derivatives from kyotorphin. **Fungal Biology**, v. 124, n. 5, p. 316–326, maio 2019.
- MARTINS, K.; GONTIJO, S. Treatment of denture stomatitis: literature review. **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 74, n. 3, p. 215–220, 2017.
- MARTORI, E. *et al.* Risk factors for denture-related oral mucosal lesions in a geriatric population. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 111, n. 4, p. 273–279, abr. 2014.
- MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. Candida albicans pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119–128, 15 fev. 2013.
- MEDEIROS, A. C. D.; ALENCAR, L. C. B.; FELISMINO, D. DE C. Schinopsis brasiliensis Engl. *In*: ALBUQUERQUE, U.; PATIL, U.; MÁTHÉ, Á. (Eds.). **Medicinal and Aromatic Plants of South America. Medicinal and Aromatic Plants of the World**. Dordrecht: Springer, Dordrecht, 2018. p. 421–429.
- MEDEIROS, E. S. *et al.* Solution blow spinning: A new method to produce micro- and nanofibers from polymer solutions. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 113, n. 4, p. 2322–2330, 15 ago. 2009.
- MENZIES, S. *et al.* Oral manifestations of lupus. **Irish Journal of Medical Science**, v. 187, n. 1, p. 91–93, fev. 2018.
- MONTEIRO, L. C. *et al.* Candida on oral cavity of pediatric individuals with ALL and its



susceptibility to nystatin and amphotericin B. **RGO - Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 67, 2019.

MORADKHANNEJHAD, L. *et al.* Electrospinning of zein/propolis nanofibers; antimicrobial properties and morphology investigation. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 29, n. 11, p. 165, 3 nov. 2018.

MORIE, A. *et al.* **Nanofibers as novel drug carrier - An overview** **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology** Taylor & Francis, , 2 jan. 2016. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/21691401.2014.927879>>. Acesso em: 17 maio. 2020

MORSE, D. J. *et al.* Denture-associated biofilm infection in three-dimensional oral mucosal tissue models. **Journal of Medical Microbiology**, v. 67, n. 3, p. 364–375, mar. 2018.

MOTEALLEH, B. *et al.* Morphology, drug release, antibacterial, cell proliferation, and histology studies of chamomile-loaded wound dressing mats based on electrospun nanofibrous poly( $\epsilon$ -caprolactone)/polystyrene blends. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 102, n. 5, p. 977–987, 2014.

MOYES, D. L. *et al.* Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. **Nature**, v. 532, n. 7597, p. 64–68, 7 abr. 2016.

MUSHI, M. F. *et al.* High Oral Carriage of Non-albicans *Candida* spp. among HIV-infected individuals. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 49, p. 185–188, ago. 2016.

NAKHAEI, O.; SHAHTAHMASSEBI, N. Study structural and up-conversion luminescence properties of polyvinyl alcohol / CaF<sub>2</sub> : erbium nanofibers for potential medical. **Nanomedicine Journal**, v. 2, n. 2, p. 160–166, 1 abr. 2015.

NASCIMENTO, G. G. F. *et al.* Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 247–256, out. 2000.

NASCIMENTO, T. R. DE L. *et al.* Current Applications of Biopolymer-based Scaffolds and Nanofibers as Drug Delivery Systems. **Current Pharmaceutical Design**, v. 25, n. 37, p. 3997–4012, 17 dez. 2019.

NEPPELENBROEK, K. H. Sustained drug-delivery system: a promising therapy for denture stomatitis? **Journal of applied oral science : revista FOB**, v. 24, n. 5, p. 420–422, 2016.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. **Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014** **Journal of Natural Products** J Nat Prod, , 25 mar. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26852623>>. Acesso em: 10 jun. 2020

NI, P. Y. *et al.* Injectable thermosensitive PEG-PCL-PEG hydrogel/acellular bone matrix composite for bone regeneration in cranial defects. **Biomaterials**, v. 35, n. 1, p. 236–248, 1 jan. 2014.

NICKERSON, W. J.; MERKEL, J. R. A Light Activation Phenomenon in the Enzymatic and Nonenzymatic Reduction of Tetrazolium Salts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 39, n. 9, p. 901–905, 1953.

NISHIMAKI, F. *et al.* Relationship Between the Quantity of Oral Candida and Systemic Condition/Diseases of the Host: Oral Candida Increases with Advancing Age and Anemia. **Mycopathologia**, v. 184, n. 2, p. 251–260, abr. 2019.

OLIVEIRA, A. M. G. C. **Avaliação da atividade antimalárica e citotóxica de plantas medicinais dos Biomas Caatinga e Amazônico**. [s.l.] Dissertação (Mestrado em Biodiversidade; Biologia Estrutural e Funcional.) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2011.

OLIVEIRA, J. *et al.* Structural and morphological characterization of micro and nanofibers produced by electrospinning and solution blow spinning: A comparative study. **Advances in Materials Science and Engineering**, v. 2013, p. 1–14, 2013.

OLIVEIRA, J. E. *et al.* Nano and submicrometric fibers of poly(D, L -lactide) obtained by solution blow spinning: Process and solution variables. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 122, n. 5, p. 3396–3405, 5 dez. 2011.

\_\_\_\_\_. Development of poly(lactic acid) nanostructured membranes for the controlled delivery of progesterone to livestock animals. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 2, p. 844–849, mar. 2013.

OLIVEIRA, J. R. DE *et al.* Antimicrobial activity of noncytotoxic concentrations of *Salvia officinalis* extract against bacterial and fungal species from the oral cavity. **General Dentistry**, v. 67, n. 1, p. 22–26, 2019.

PARIZE, D. *et al.* Solution blow spinning: Parameters optimization and effects on the properties of nanofibers from poly(lactic acid)/dimethyl carbonate solutions. **Journal of Materials Science**, v. 51, n. 9, p. 4627–4638, 3 maio 2016.

PATHIRANA, R. U. *et al.* Filamentous non-albicans *Candida* species adhere to *Candida albicans* and benefit from dual biofilm growth. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. MAY, p. 1188, 2019.

PETERS, B. M. *et al.* Microbial interactions and differential protein expression in *Staphylococcus aureus* -*Candida albicans* dual-species biofilms. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 493–503, ago. 2010.

PILEHVAR-SOLTANAHMADI, Y. *et al.* An Overview on Application of Natural Substances Incorporated with Electrospun Nanofibrous Scaffolds to Development of Innovative Wound Dressings. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 5, p. 414–427, 2017.

RAO, T. *et al.* **The pharmacogenetics of natural products: A pharmacokinetic and pharmacodynamic perspective** *Pharmacological Research*, , 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31129178>>. Acesso em: 10 jun. 2020

REDDY, N.; XU, H.; YANG, Y. Unique natural-protein hollow-nanofiber membranes produced by weaver ants for medical applications. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 7, p. 1726–1733, jul. 2011.

SANCHES, M. D. *et al.* Differential behavior of non-albicans *Candida* species in the central nervous system of immunocompetent and immunosuppressed mice. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. JAN, 8 jan. 2019.

SANGLARD, D.; COSTE, A.; FERRARI, S. **Antifungal drug resistance mechanisms in**

**fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation****FEMS Yeast Research**, nov. 2009. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsyr/article-lookup/doi/10.1111/j.1567-1364.2009.00578.x>>. Acesso em: 17 maio. 2020

SANTOS, A. N. *et al.* Catechins As Model Bioactive Compounds For Biomedical Applications. **Current pharmaceutical design**, v. 26, 2020.

SANTOS, C. C. S. *et al.* Evaluation of the toxicity and molluscicidal and larvicidal activities of schinopsis brasiliensis stem bark extract and its fractions. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 24, n. 3, p. 298–303, maio 2014.

SANTOS, R. L. **Desenvolvimento de um dentifrício a partir de extrato nebulizado de Schinopsis brasiliensis Engler**. [s.l.] Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2013.

SANTOS, V. *et al.* Antifungal effect of electrospun nanofibers containing cetylpyridinium chloride against Candida albicans. **Brazilian Oral Research**, v. 28, n. 1, p. 1–6, 2014.

SARAIVA, A. M. *et al.* In vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial and toxicity properties of extracts of schinopsis brasiliensis engl. (Anacardiaceae). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n. 14, p. 1724–1731, 15 out. 2011.

SARAIVA, A. M. *et al.* Atividade antimicrobiana e sinérgica das frações das folhas de Schinopsis brasiliensis Engl. frente a clones multirresistentes de Staphylococcus aureus. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 2, p. 199–207, 2013.

SARTORATTO, A. *et al.* Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 275–280, dez. 2004.

SCHAFFAZICK, S. R. *et al.* Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: Nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, n. 3, p. 501–505, nov. 2003.

SEMNANI, K. *et al.* Antifungal Activity of Eugenol Loaded Electrospun PAN Nanofiber Mats Against Candida Albicans. **Current Drug Delivery**, v. 15, n. 6, p. 860–866, 27 jun. 2018.

SETTE-DE-SOUZA, P. H. *et al.* Thermal decomposition profile of chitosan microparticles produced with Schinopsis brasiliensis Engler extract. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 131, n. 1, p. 829–834, 1 jan. 2018.

SHAPIRO, R. S.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Regulatory Circuitry Governing Fungal Development, Drug Resistance, and Disease. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 75, n. 2, p. 213–267, 1 jun. 2011.

SHARMA, R. *et al.* Development, optimization and evaluation of polymeric electrospun nanofiber: A tool for local delivery of fluconazole for management of vaginal candidiasis. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 524–531, 2016.

SILVA, K. M. A. *et al.* Modulation of the erythromycin resistance in Staphylococcus aureus by ethanolic extracts of Ximenia americana L and Schinopsis brasiliensis Engl. **Boletim Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, v. 14, n. 2, p. 92–98, 2015.

SILVA, M. S. P. **Ensaios pré-clínicos com extratos de plantas medicinais do semi-árido**

**nordestino: contribuição para o tratamento de infecções da cavidade bucal.** [s.l.]  
Dissertação (Mestrado em Epidemiologia e Promoção de Saúde) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2011.

\_\_\_\_\_. Study bioprospecting of medicinal plant extracts of the semiarid northeast: Contribution to the control of oral microorganisms. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1–6, 2012.

SIRELKHATIM, N. *et al.* Polyacrylonitrile nanofibrous mat from electrospinning: Born with potential anti-fungal functionality. **European Polymer Journal**, v. 119, p. 176–180, 1 out. 2019.

SOPPIMATH, K. S. *et al.* **Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices** **Journal of Controlled Release**, jan. 2001. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365900003394>>. Acesso em: 17 maio. 2020

SOUZA, M. *et al.* Controlled release of linalool using nanofibrous membranes of poly(lactic acid) obtained by electrospinning and solution blow spinning: A comparative study. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 15, n. 8, p. 5628–5636, 1 ago. 2015.

STAPLETON, P. D. *et al.* Modulation of  $\beta$ -lactam resistance in *Staphylococcus aureus* by catechins and gallates. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 23, n. 5, p. 462–467, maio 2004.

TARAPAN, S. *et al.* Oral *Candida* colonization in xerostomic postradiotherapy head and neck cancer patients. **Oral Diseases**, v. 25, n. 7, p. 1798–1808, out. 2019.

TONG, Y.; TANG, J. *Candida albicans* infection and intestinal immunity. **Microbiological Research**, v. 198, p. 27–35, maio 2017.

TONGLAIROUM, P. *et al.* Fast-acting clotrimazole composited PVP/HP $\beta$ CD nanofibers for oral candidiasis application. **Pharmaceutical Research**, v. 31, n. 8, p. 1893–1906, 20 ago. 2014.

\_\_\_\_\_. Fabrication of mucoadhesive chitosan coated polyvinylpyrrolidone/cyclodextrin/clotrimazole sandwich patches for oral candidiasis. **Carbohydrate Polymers**, v. 132, p. 173–179, 5 nov. 2015.

\_\_\_\_\_. Fabrication and Evaluation of Nanostructured Herbal Oil/Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin/Polyvinylpyrrolidone Mats for Denture Stomatitis Prevention and Treatment. **AAPS PharmSciTech**, v. 17, n. 6, p. 1441–1449, 28 dez. 2016.

TSENG, Y. Y. *et al.* Biodegradable drug-eluting poly[lactic-co-glycol acid] nanofibers for the sustainable delivery of vancomycin to brain tissue: In vitro and in vivo studies. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 4, n. 9, p. 1314–1321, 18 set. 2013.

TSUTSUMI, C.; TAKAKUDA, K.; WAKABAYASHI, N. Reduction of *Candida* biofilm adhesion by incorporation of prereacted glass ionomer filler in denture base resin. **Journal of Dentistry**, v. 44, p. 37–43, jan. 2016.

UHRICH, K. E. *et al.* Polymeric Systems for Controlled Drug Release. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 11, p. 3181–3198, 10 nov. 1999.

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A. T. **Antifungal resistance and new**

- strategies to control fungal infections***International Journal of Microbiology*, 2012.  
Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ijmicro/2012/713687/>>. Acesso em: 17 maio. 2020
- VEILLEUX, M. P.; GRENIER, D. Determination of the effects of cinnamon bark fractions on *Candida albicans* and oral epithelial cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 19, n. 1, p. 303, 8 nov. 2019.
- VIANA, J. F. C. *et al.* Antifungal nanofibers made by controlled release of sea animal derived peptide. **Nanoscale**, v. 7, n. 14, p. 6238–6246, 26 mar. 2015.
- VILA, T. *et al.* **Oral candidiasis: A disease of opportunity***Journal of Fungi*Multidisciplinary Digital Publishing Institute, , 16 jan. 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2309-608X/6/1/15>>. Acesso em: 17 maio. 2020
- WANG, F. *et al.* Preparation, characterization and properties of porous PLA/PEG/curcumin composite Nanofibers for antibacterial application. **Nanomaterials**, v. 9, n. 4, p. 508, 2 abr. 2019.
- WATTIER, R. L.; STEINBACH, W. J. Antifungal Agents. *In*: LONG, S. S.; PROBER, C. G.; FISCHER, M. (Eds.). . **Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases**. 5. ed. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 1532-1541.e3.
- WHITE, T. C.; MARR, K. A.; BOWDEN, R. A. Clinical, Cellular, and Molecular Factors That Contribute to Antifungal Drug Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 2, p. 382–402, 1998.
- WILLIAMS, D. F. On the nature of biomaterials. **Biomaterials**, v. 30, n. 30, p. 5897–5909, 2009.
- WU, Y. *et al.* Microglia and amyloid precursor protein coordinate control of transient *Candida cerebritis* with memory deficits. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 58, 4 dez. 2019.
- XU, F. *et al.* Improvement of cytocompatibility of electrospinning PLLA microfibers by blending PVP. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, n. 6, p. 1331–1338, 22 jun. 2009.
- XU, J. *et al.* Eucalyptal D enhances the antifungal effect of fluconazole on fluconazole-resistant *Candida albicans* by competitively inhibiting efflux pump. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. JUN, 20 jun. 2019.
- YADAV, P. *et al.* **Biomedical biopolymers, their origin and evolution in biomedical sciences: A systematic review***Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 2015.  
Disponível em: <[http://jcdr.net/article\\_fulltext.asp?issn=0973-709x&year=2015&volume=9&issue=9&page=ZE21&issn=0973-709x&id=6565](http://jcdr.net/article_fulltext.asp?issn=0973-709x&year=2015&volume=9&issue=9&page=ZE21&issn=0973-709x&id=6565)>. Acesso em: 17 maio. 2020
- YU, H. *et al.* Enhancement of solubility and dissolution rate of cryptotanshinone, tanshinone I and tanshinone IIA extracted from *Salvia miltiorrhiza*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 35, n. 8, p. 1457–1464, 1 ago. 2012.
- ZAGO, P. M. W. *et al.* Anti-biofilm action of *Chenopodium ambrosioides* extract, cytotoxic potential and effects on acrylic denture surface. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. JULY, p. 1724, 13 ago. 2019.

ZANDER, Z. K. *et al.* Control of Mesh Size and Modulus by Kinetically Dependent Cross-Linking in Hydrogels. **Advanced Materials**, v. 27, n. 40, p. 6283–6288, 1 out. 2015.

ZHANG, W.; RONCA, S.; MELE, E. Electrospun nanofibres containing antimicrobial plant extracts. **Nanomaterials**, v. 7, n. 2, 2017.

ZHANG, Y. Q. *et al.* Requirement for ergosterol in V-ATPase function underlies antifungal activity of azole drugs. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 6, p. e1000939, 3 jun. 2010.

# ANEXO

---

## ANEXO

Normas para submissão de artigos ao periódico *Archives of Oral Biology*.







## ARCHIVES OF ORAL BIOLOGY

A Multidisciplinary Journal of Oral & Craniofacial Sciences

### AUTHOR INFORMATION PACK

#### TABLE OF CONTENTS

•	<b>Description</b>	<b>p.1</b>
•	<b>Audience</b>	<b>p.1</b>
•	<b>Impact Factor</b>	<b>p.1</b>
•	<b>Abstracting and Indexing</b>	<b>p.2</b>
•	<b>Editorial Board</b>	<b>p.3</b>
•	<b>Guide for Authors</b>	<b>p.4</b>



#### DESCRIPTION

*Archives of Oral Biology* is an international journal which aims to publish papers of the highest scientific quality in the oral and craniofacial sciences including:  
 Developmental biology Cell and molecular biology Molecular genetics Immunology Pathogenesis Microbiology Biology of dental caries and periodontal disease Forensic dentistry Neuroscience Salivary biology Mastication and swallowing Comparative anatomy Paeleodontology *Archives of Oral Biology* will also publish expert reviews and articles concerned with advancement in relevant methodologies. The journal will only consider clinical papers where they make a significant contribution to the understanding of a disease process. Journal Metrics

#### AUDIENCE

Oral biologists, physiologists, anatomists, pathologists.

#### IMPACT FACTOR

2019: 1.931 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2020

## ABSTRACTING AND INDEXING

---

Elsevier BIOBASE  
 Nutrition Research Newsletter  
 Nutrition Abstracts and Reviews Series  
 PharmacoEconomics and Outcomes News  
 Pig News and Information  
 Reactions Weekly  
 Review of Medical and Veterinary Entomology  
 Science Citation Index  
 SIIC Data Bases  
 Soils and Fertilizers  
 Sugar Industry Abstracts  
 Tropical Diseases Bulletin  
 Veterinary Bulletin  
 Vitis Viticulture and Enology Abstracts  
 Biological Abstracts  
 Animal Breeding Abstracts  
 BIOSIS Previews  
 Current Awareness in Biological Sciences  
 Abstracts in Anthropology  
 Abstracts on Hygiene and Communicable Diseases  
 Dairy Science Abstracts  
 GeoRef  
 Index Veterinarius  
 Inpharma Weekly  
 Medical and Surgical Dermatology  
 Abstracts of Mycology  
 AgBiotech News and Information  
 Maize Abstracts Online  
 Postharvest News and Information  
 Review of Agricultural Entomology  
 Small Animals  
 Soybean Abstracts (Online Edition)  
 Speleological Abstracts  
 Agris  
 Aquatic Sciences and Fisheries Abstracts  
 Arts and Humanities Citation Index  
 CABI Information  
 Cancerlit  
 Gale Database of Publications & Broadcast Media  
 Global Health  
 Inside Conferences  
 ISI Science Citation Index  
 Pascal Francis  
 RTECS (Registry of Toxic Effects of Chemical Substances)  
 Web of Science  
 SPORTDiscus  
 TOXFILE  
 UnCover  
 Zoological Record  
 BIOSIS Toxicology  
 CSA Life Sciences Abstracts  
 Research Alert  
 BIOSIS Citation Index  
 Elsevier BIOBASE  
 Chemical Abstracts  
 Current Contents - Life Sciences  
 Current Contents  
 Current Contents  
 Current Contents  
 PubMed/Medline

---

## EDITORIAL BOARD

---

### *Editors-in-Chief*

**S.W. Cadden**, University of Dundee, DD1 4HN, Dundee, United Kingdom

**F. T. Lundy**, Queen's University Belfast, BT7 1NN, Belfast, United Kingdom

### *Associate Editors*

**G.N. Belibasakis**, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden

**P.M. Castelo**, Federal University of Sao Paulo, Institute of Environmental, Chemical and Pharmaceutical Sciences, Diadema, Brazil

**D. Grenier**, Laval University, Quebec, Quebec, Canada

**J.T. Wright**, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina, United States

### *Editorial Board*

**V. Arana-Chavez**, São Paulo, Brazil

**Z. Bian**, Wuhan, China

**G. H. Carpenter**, London, United Kingdom

**J-h Chen**, Xian, China

**K. Cogo-Müller**, São Paulo, Brazil

**C. Dawes**, Winnipeg, Canada

**X. Duan**, Xian, China

**M.B.D. Gaviao**, Campinas, Brazil

**H. van der Glas**, Utrecht, Netherlands

**S. Herring**, Seattle, United States

**Y. Jin**, Xian, China

**C. P. McArthur**, Kansas City, United States

**L. Mei**, Dunedin, New Zealand

**G. Murray**, Sydney, Australia

**J. Y. Ro**, Baltimore, United States

**C. Robinson**, Leeds, United Kingdom

**L. P. Samaranayake**, Sai Ying Pun, Hong Kong

**B.J. Sessle**, Toronto, Canada

**P.T. Sharpe**, London, United Kingdom

**A.J. Smith**, Birmingham, United Kingdom

**P. Stashenko**, Cambridge, United States

**D Steinberg**, Jerusalem, Israel

**H. Suda**, Tokyo, Japan

**K. Tanne**, Higashi-Hiroshima, Japan

**L. Walsh**, Brisbane, Australia

**M.Q. Wang**, Xian, China

## GUIDE FOR AUTHORS

---

Editors-in-Chief:

**Professor S W Cadden, Dundee, Scotland**  
**Dr Fionnuala T. Lundy, Northern Ireland, UK**

Archives of Oral Biology is an international journal which aims to publish papers of the highest scientific quality reporting new knowledge from the orofacial region including:

- developmental biology
- cell and molecular biology
- molecular genetics
- immunology
- pathogenesis
- microbiology
- biology of dental caries and periodontal disease
- forensic dentistry
- neuroscience
- salivary biology
- mastication and swallowing
- comparative anatomy
- paeleodontology

Archives of Oral Biology will also publish expert reviews and articles concerned with advancement in relevant methodologies. The journal will consider clinical papers only where they make a significant contribution to the understanding of a disease process.

These guidelines generally follow the [Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals](#)

### **Types of Contribution**

Original papers and review articles are welcomed. There will be no differentiation on the basis of length into full or short communications. Editorial commentaries will also be considered but only by invitation. All submissions will be refereed.

### **Page charges**

This journal has no page charges.

### **Submission checklist**

You should use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check all relevant sections in this Guide for Authors for more details.

### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

#### *Manuscript:*

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

#### *Graphical Abstracts (where applicable)*

#### *Highlights (where applicable)*

#### *Supplemental files (where applicable)*

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa

- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- Relevant declarations of interest have been made
- Declarations of authors' contributions have been made if there are four or more authors
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#)

## BEFORE YOU BEGIN

### *Ethics in publishing*

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

### *Studies in humans and animals*

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association \(Declaration of Helsinki\)](#) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the [Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](#) and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms [sex](#) and [gender](#) should be used correctly.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. [Animals \(Scientific Procedures\) Act, 1986](#) and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the [National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals \(NIH Publications No. 8023, revised 1978\)](#) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

### *Declaration of interest*

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

### *Submission declaration and verification*

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically, without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article is likely to be checked by the originality detection service CrossCheck.

### *Preprints*

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information).



### **Use of inclusive language**

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

### **Author contributions**

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. [More details and an example](#)

### **Authorship**

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

#### *Article transfer service*

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. [More information.](#)

### **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

### **Author rights**

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information.](#)

#### *Elsevier supports responsible sharing*

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

### **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

### **Open access**

Please visit our [Open Access page](#) for more information.

#### *Elsevier Researcher Academy*

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

#### *Language (usage and editing services)*

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's Author Services.

### **Submission**

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

## **PREPARATION**

### **Peer review**

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer review.](#)

#### *Use of word processing software*

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To minimize unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

### **Article structure**

#### *Manuscript Structure*

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text (Introduction, Materials & Methods, Results, Discussion for an original paper), Acknowledgments, Appendix, References, Figure Captions and then Tables. Do not import the Figures or Tables into your text. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers.



### *Introduction*

This should be a succinct statement of the problem investigated within the context of a brief review of the relevant literature. Literature directly relevant to any inferences or argument presented in the Discussion should in general be reserved for that section. The introduction may conclude with the reason for doing the work but should not state what was done nor the findings.

### *Materials and Methods*

Enough detail must be given here so that another worker can repeat the procedures exactly. Where the materials and methods were exactly as in a previous paper, it is not necessary to repeat all the details but sufficient information must be given for the reader to comprehend what was done without having to consult the earlier work.

Authors are requested to make plain that the conditions of animal and human experimentation are as outlined in the "Ethics" and "Studies on Animals" sections above

### *Results or Findings*

These should be given clearly and concisely. Care should be taken to avoid drawing inferences that belong to the Discussion. Data may be presented in various forms such as histograms or tables but, in view of pressure on space, presentation of the same data in more than one form is unacceptable.

### *Discussion*

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is occasionally appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

### *Conclusions*

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion section.

### **Essential title page information**

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

As titles frequently stand alone in indexes, bibliographic journals etc., and indexing of papers is, to an increasing extent, becoming computerized from key words in the titles, it is important that titles should be as concise and informative as possible. Thus the animal species to which the observations refer should always be given and it is desirable to indicate the type of method on which the observations are based, e.g. chemical, bacteriological, electron-microscopic, histochemical, etc. A "running title" of not more than 40 letters and spaces must also be supplied. A keyword index must be supplied for each paper.

### **Highlights**

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).



Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

### **Structured abstract**

The paper should be prefaced by an abstract aimed at giving the entire paper in miniature. Abstracts should be no longer than 250 words and should be structured as per the guidelines published in the Journal of the American Medical Association (JAMA 1995; 273: 27-34). In brief, the abstract should be divided into the following sections: (1) Objective; (2) Design - if clinical, to include setting, selection of patients, details on the intervention, outcome measures, etc.; if laboratory research, to include details on methods; (3) Results; (4) Conclusions.

### **Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### **Abbreviations**

As Archives of Oral Biology is a journal with a multidisciplinary readership, abbreviations, except those universally understood such as mm, g, min. u.v., w/v and those listed below, should be avoided if possible. Examples of abbreviations which may be used without definition are: ADP, AMP, ATP, DEAE-cellulose, DNA, RNA, EDTA, EMG, tris.

Other abbreviations used to improve legibility should be listed as a footnote on the title page as well as being defined in both the abstract and the main text on first usage. Chemical symbols may be used for elements, groups and simple compounds, but excessive use should be avoided. Abbreviations other than the above should not be used in titles and even these should be avoided if possible.

### **Acknowledgements**

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.) but who did not meet all the criteria for authorship (see Authorship section above).

### **Formatting of funding sources**

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### **Bacterial nomenclature**

Organisms should be referred to by their scientific names according to the binomial system. When first mentioned the name should be spelt in full and in italics. Afterwards the genus should be abbreviated to its initial letter, e.g. '*S. aureus*' not 'Staph. aureus'. If abbreviation is likely to cause confusion or render the intended meaning unclear, the names of microbes should be spelt in full. Only those names which were included in the Approved List of Bacterial Names, Int J Syst Bacteriol 1980; 30: 225-420 and those which have been validly published in the Int J Syst Bacteriol since 1 January 1980 have standing in nomenclature. If there is good reason to use a name that does not have standing in nomenclature, the names should be enclosed in quotation marks and an appropriate statement concerning the nomenclatural status of the name should be made in the text (for an example see

Int J Syst Bacteriol 1980; 30: 547-556). When the genus alone is used as a noun or adjective, use lower case Roman not italic, e.g. 'organisms were staphylococci' and 'streptococcal infection'. If the genus is specifically referred to use italics e.g. 'organisms of the genus *Staphylococcus*'. For genus in plural, use lower case roman e.g. 'salmonellae'; plurals may be anglicized e.g. 'salmonellas'. For trivial names, use lower case Roman e.g. 'meningococcus'

## Artwork

### Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

### Electronic artwork

#### General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

#### Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

#### Illustration services

[Elsevier's Author Services](#) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

## Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.



### Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

### Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software.](#)

### APA (American Psychological Association) 7th Edition

**Text:** Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Seventh Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be [ordered online](#) or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK.

**List:** references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

#### Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications*, 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2018). The art of writing a scientific article. *Heliyon*, 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style*. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). New York: E-Publishing Inc.

Reference to a website:

Cancer Research UK. Cancer statistics reports for the UK. (2003). <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> Accessed 13 March 2003.

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T. (2015). *Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions*. Mendeley Data, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Reference to a conference paper or poster presentation:

Engle, E.K., Cash, T.F., & Jarry, J.L. (2009, November). The Body Image Behaviours Inventory-3: Development and validation of the Body Image Compulsive Actions and Body Image Avoidance Scales. Poster session presentation at the meeting of the Association for Behavioural and Cognitive Therapies, New York, NY.

### Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

### *Research data*

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data page](#).

### *Data linking*

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article.

When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#). For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

### *Mendeley Data*

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

### *Data statement*

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

## **AFTER ACCEPTANCE**

### ***Online proof correction***

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

### **Offprints**

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Author Services](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

### **Statistical analysis**

Authors should ensure that the presentation and statistical testing of data are appropriate and should seek the advice of a statistician if necessary. A number of common errors should be avoided, e.g.:

- Use of parametric tests when non-parametric tests are required
- Inconsistencies between summary statistics and statistical tests such as giving means and standard deviations for data which were analysed with non-parametric tests.
- Multiple comparisons undertaken with multiple t tests or non-parametric equivalents rather than with analysis of variance (ANOVA) or non-parametric equivalents.
- Post hoc tests being used following an ANOVA which has yielded a non-significant result.
- Incomplete names for tests (e.g. stating "Student's t test" without qualifying it by stating "single sample", "paired" or "independent sample")
- n values being given in a way which obscures how many independent samples there were (e.g. stating simply n=50 when 10 samples/measurements were obtained from each of 5 animals/human subjects).
- Stating that  $P=0.000$  (a figure which is generated by some computer packages). The correct statement (in this case) is  $P<0.0005$ .

### **AUTHOR INQUIRIES**

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or [find out when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com>