



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

WALESKA OHANA DE SOUZA MELO

**DESENVOLVIMENTO DE HIDROGEL INCORPORADO AO EXTRATO DE
Byrsonima gardneriana (A. JUSS) PARA TRATAMENTO DE CANDIDOSE
ORAL**

CAMPINA GRANDE/ PB

2022

WALESKA OHANA DE SOUZA MELO

**DESENVOLVIMENTO DE HIDROGEL INCORPORADO AO EXTRATO DE
Byrsonima gardneriana (A. JUSS) PARA TRATAMENTO DE CANDIDOSE
ORAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Jozinete Vieira Pereira Marques

Coorientador: Prof. Dr. João Augusto Oshiro Junior

CAMPINA GRANDE/ PB

2022

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.

M528d Melo, Waleska Ohana de Souza.
Desenvolvimento de hidrogel incorporado ao extrato de *Byrsonima gardneriana* (A. Juss) para tratamento de candidose oral [manuscrito] / Waleska Ohana de Souza Melo. - 2022.
78 p. : il. colorido.

Digitado.

Tese (Doutorado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2022.

"Orientação : Profa. Dra. Jozinete Vieira Pereira Marques , Departamento de Odontologia - CCBS."

"Coorientação: Prof. Dr. João Augusto Oshiro Junior , Departamento de Farmácia - CCBS."

1. Candida. 2. Candidíase bucal. 3. Fitoterapia. 4. Hidrogeis. 5. Testes de Toxicidade Aguda. I. Título

21. ed. CDD 617.6

WALESKA OHANA DE SOUZA MELO

DESENVOLVIMENTO DE HIDROGEL INCORPORADO AO EXTRATO DE
Byrsonima gardneriana (A. JUSS) PARA TRATAMENTO DE CANDIDOSE
ORAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Odontologia da Universidade Estadual da
Paraíba como requisito à obtenção do título de
Doutor em Odontologia.

Aprovada em: 25/08/2022

Comissão Julgadora:



Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho (Examinador - Externo)
Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)



Profa. Dra. Ana Carolina Lira de Albuquerque (Examinadora - Externa)
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)



Profa. Dra. Andréa Cristina Barbosa da Silva (Examinadora - Interna)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Profa. Dra. Daliana Queiroga de Castro Gomes (Examinadora - Interna)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Profa. Dra. Jozinete Vieira Pereira Marques (Orientadora)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Aos meus pais, **Walder Clebson** e **Luciene Dasneves**, pelos incansáveis apoios, alento e amor, dedico.

“Que jamais o ruído das coisas que passam nos faça esquecer a silenciosa presença d'Aquele que mora em nós. Que jamais a fascinação das coisas visíveis nos afaste o coração dos esplendores escondidos no mundo invisível. Desenvolvi em nós o gosto do silêncio e ensinai-nos, a Vosso exemplo, a fazer de nossa ação uma comunhão fiel com a vontade do Pai, para o humilde serviço de Jesus nas almas!”

Trecho da Oração à Nossa Senhora Virgem do Silêncio

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1: Estrutura química do PF127..... | 24 |
| Figura 2: Fluxograma das etapas da pesquisa..... | 28 |
| Figura 3: Desenvolvimento das formulações hidrogel..... | 32 |
| Figura 4: Obtenção da espalhabilidade das amostras estudadas (HP e HBG)..... | 34 |
| Figura 5: Placas com ASD divididas em oito seções para a semadura das alíquotas..... | 36 |
| Figura 6: Camundongos alojados em gaiolas microisoladoras com grade..... | 37 |
| Figura 7: Formulações à base de PF127 antes e após a gelificação em temperatura ambiente..... | 43 |
| Figura 8: Espalhabilidade (mm ²) do HP e HBG..... | 45 |
| Figura 9: Curva com comportamento decrescente da Viscosidade (cP) das amostras HP e HBG em 5°C e 30°C..... | 46 |
| Figura 10: Redução logarítmica entre os grupos quando comparados ao controle de crescimento..... | 48 |
| Figura 11: Fotomicrografia dos cortes histológicos sob diferentes condições experimentais..... | 51 |
| Figura 12: Fotomicrografia dos eritrócitos após administração em dose única..... | 52 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| Quadro 1: Composição das amostras dos hidrogeis estudados..... | 31 |
| Quadro 2: Distribuição da amostra em grupos para realização dos testes de Toxicidade Oral Aguda e Potencial Aneugênico e Clastogênico..... | 37 |
| Quadro 3: pH, cor e odor de HP e HBG antes e após a centrifugação..... | 44 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Sugestões indicando atividades biológicas para o Ácido L-Piroglutâmico e o Ácido octanoico, éster etílico, análise pela ferramenta PASS <i>online</i> | 40 |
| Tabela 2: Propriedades moleculares do ácido L-piroglutâmico e do Ácido octanoico, éster etílico, calculadas no <i>software Moliinspiration</i> | 41 |
| Tabela 3: Classificação das propriedades ADMET (<i>Software admetSAR</i>)..... | 42 |
| Tabela 4: Propriedades de regressão ADMET, calculadas no <i>software admetSAR</i> para os ácidos L-Piroglutâmico e Octanóico, éster etílico..... | 42 |
| Tabela 5: Estabilidade Preliminar do HP e do HBG..... | 45 |
| Tabela 6: Valores em média \pm desvio-padrão da Viscosidade (cP) do HP e HBG nas temperaturas de 5°C e 30°C..... | 47 |
| Tabela 7: Efeito antifúngico contra <i>C. albicans</i> por diferentes tratamentos..... | 48 |
| Tabela 8: Observação dos sinais de toxicidade aguda D0-D14..... | 49 |
| Tabela 9: Efeitos do tratamento agudo de HBG na mudança de peso de camundongos fêmeas tratadas..... | 50 |
| Tabela 10: Efeitos do tratamento agudo de HBG no consumo de água e ingestão de ração de camundongos fêmeas tratadas..... | 50 |
| Tabela 11: Efeitos do tratamento agudo de HBG no peso absoluto dos órgãos de camundongos fêmeas tratados..... | 50 |
| Tabela 12: Efeitos do tratamento agudo de HBG nos índices (peso relativo) dos órgãos de camundongos fêmeas tratados..... | 51 |
| Tabela 13: Análise da mutagenicidade de HP e HBG em células de sangue periférico de camundongos após administração única (2.000 mg/kg)..... | 52 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANOVA – Análise da Variância

ADMET - Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASD – Ágar Saboraud Dextrose

ATCC- *American Type Culture Collection*

C - Cancerígeno

CEUA – Comitê de Ética no Uso Animal

CFM - Concentração Fungicida Mínima

CG – EM – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas

CIM – Concentração Inibitória Mínima

cLogP – coeficiente de partição octanol/água

cm² – centímetro quadrado

cP - Centopoiese

CSD – Caldo *Saboraud Dextrose*

CYP450 – Citocromo P450

D0 – Dia zero

D14 – Dia 14

Da – Daltons

DMSO – dimetilsulfóxido

d.p. – desvio-padrão da média

DPPH - 1,1-difenil-2-picril-hidrozil

Ei - Espalhabilidade

e.p.m. – erro-padrão da média

FM – Fórmula Molecular

g – grama

GSH - Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos

h – hora

HERG - gene codificador de canais de potássio

HP – Hidrogel de PF127 a 20%

HPMC – hidroxipropilmetilcelulose

HBG – Hidrogel de PF127 incorporado com o extrato etanólico de *B. gardneriana*

IF – Inibição Fraca

IFAV - Insumos Farmacêuticos Ativos Vegetais

kg – kilograma

L – litro

LD50 – Dose Letal mediana (50%)

LDCPF - Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos

log₁₀ – logaritmo base 10

m/v – relação massa/volume

min - minuto

mL – mililitro

mm – milímetro

MS – Ministério da Saúde

m/z – razão massa/carga

mg/kg – miligrama/quilo

nm – nanometro

nALH – Número de aceptores de ligações de hidrogênio

NC – Não Cancerígeno

nDLH – Número de doadores de ligações de hidrogênio

NI – Não Inibidor

NR – Não Requerido

nrotb – número de bandas rotáveis

NS – Não Substrato

NT – Não Tóxico

OECD - *Organization of Economic Co-operation and Development*

P – Probabilidade

Pa – Probabilidade de ser ativo

PF127 – Pluronic® F127

Pi – Probabilidade de ser inativo

PASS - *Prediction of Activity Spectra for Substances*

PB – Propenso à Biodegradação

PBS - Tampão fosfato salino

pH - Potencial Hidrogeniônico

PM – Peso Molecular

rpm – rotações por minuto

SA – Sem Alterações

SNC - Sistema Nervoso Central

SPSS – *Statistical Package for Social Sciences*

T – Temperatura

TPSA – Área Superficial Polar Topográfica

UEPB – Universidade Estadual da Paraíba

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

UFCG – Universidade Federal de Campina Grande

UFC/ml – Unidades Formadoras de Colônia por mililitro

UFPB – Universidade Federal da Paraíba

°C – Graus Celsius

% - Porcento

± - Mais ou menos

µg/ml – Microgramas por mililitros

µL – Microlitros

x – Vezes

< - Menor que

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 17 |
| 2.1 Considerações sobre candidose oral | 17 |
| 2.2 Resistência microbiana | 19 |
| 2.3 Uso de plantas medicinais na Odontologia | 20 |
| 2.4 <i>Byrsonima gardneriana</i> (A. Juss) | 21 |
| 2.5 Formulações farmacológicas em hidrogel | 22 |
| 2.6 Hidrogeis de PF127 | 23 |
| 2.7 Estado da arte | 25 |
| 3 OBJETIVOS | 27 |
| 3.1 Objetivo geral | 27 |
| 3.2 Objetivos específicos | 27 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS | 28 |
| 4.1 Delineamento do estudo | 29 |
| 4.2 Aspectos éticos | 29 |
| 4.3 Local de estudo | 29 |
| 4.4 Material vegetal | 29 |
| 4.5 Ensaios <i>in silico</i> | 30 |
| 4.6 Ensaios <i>in vitro</i> | 31 |
| 4.6.1 Preparação do hidrogel de PF127 com e sem o extrato de <i>B. gardneriana</i> | 31 |
| 4.6.2 Potencial anti-<i>Candida</i> | 35 |
| 4.7 Ensaios <i>in vivo</i> | 36 |
| 4.7.1 Utilização de Modelo Animal | 36 |
| 4.8 Análises estatísticas | 39 |
| 5 RESULTADOS | 40 |
| 6 DISCUSSÃO | 53 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS | 63 |
| REFERÊNCIAS | 64 |
| ANEXOS | 75 |
| Anexo A – Certificado de Aprovação do Projeto de Pesquisa pelo CEUA – Comitê de Ética no Uso Animal da Universidade Estadual da Paraíba | 76 |

DESENVOLVIMENTO DE HIDROGEL INCORPORADO AO EXTRATO DE *Byrsonima gardneriana* (A. JUSS) PARA TRATAMENTO DE CANDIDOSE ORAL

RESUMO

Este estudo objetivou desenvolver um hidrogel à base de Pluronic® F127 (PF127) incorporado ao extrato de *Byrsonima gardneriana* (A. Juss), analisando, *in silico*, a toxicidade teórica e atividades farmacológica e farmacocinética de compostos majoritários do extrato, *in vitro*, propriedades físico-químicas e atividade anti-*Candida* das formulações e, *in vivo*, toxicidade oral aguda e potencial aneugênico e clastogênico. O ensaio, *in silico*, a partir de dois compostos majoritários do extrato (ácido L-Piroglutâmico e do ácido octanoico, éster etílico) foi realizado a partir dos *softwares* PASS *online*, *Moliispiration* e ADMETSar. O hidrogel à base de PF127 foi desenvolvido, em banho de gelo, com a concentração de 20% do polímero (HP) e a incorporação do extrato de *B. gardneriana* (HBG). Foram analisadas as propriedades físico-químicas de resistência à centrifugação, pH, estabilidade preliminar, espalhabilidade e viscosidade. O potencial anti-*Candida* foi avaliado por meio da atividade antifúngica sobre células planctônicas de *C. albicans* (ATCC 10231). Além disso, foram realizados testes *in vivo* com modelos animais por meio da toxicidade oral aguda e potencial Aneugênico e clastogênico em camundongos. Os dados foram analisados por meio dos testes de Mann-Whitney, Wilcoxon, t de Student e ANOVA *one-way* seguido por pós-teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). Os resultados mostraram que ambos compostos investigados, *in silico*, apresentaram propriedades antibacteriana e antifúngica, possivelmente exibem capacidade de sofrer absorção através da barreira hematoencefálica e do intestino humano. Teoricamente, são fracos inibidores do gene codificador de canais de potássio (HERG), não tóxicos pelo teste AMES, propensos à biodegradação e com categoria III de toxicidade oral aguda. No que tange os ensaios *in vitro*, ao analisar as propriedades físico-químicas, HP e HBG não apresentaram, após a centrifugação, precipitados, separação de fases, alteração de cor, odor e pH, sendo este, respectivamente, 6,7 e 5,75. Não houve diferença estatisticamente significativa da espalhabilidade ou entre o pH das amostras no teste de estabilidade preliminar. Além disso, ao analisar a viscosidade HP e HBG se comportaram como fluidos não newtonianos. O HBG apresentou redução de 3 \log_{10} quando comparado ao controle de crescimento, representando redução microbiana de 99,9% sobre *C. albicans*. Quanto ao modelo animal, não foram observados sinais de toxicidade nos exames macroscópico e histopatológico, não ocorrendo morbidade ou mortalidade entre os animais. No teste do micronúcleo, observou-se que, ao comparar os grupos HP e HBG não houve diferença estatisticamente significativa na contagem de micronúcleos em eritrócitos. Conclui-se que compostos majoritários do extrato de *B. gardneriana* demonstraram possíveis propriedades farmacológicas e farmacocinéticas, além de baixa toxicidade teórica. O HBG apresentou importantes propriedades físico-químicas admissíveis para um fármaco de aplicação tópica na mucosa oral e atividade anti-*Candida albicans*, não apresentando sinais de toxicidade oral aguda em camundongos, além de sugerir-se a ausência de efeitos aneugênicos e clastogênicos. Para tanto, pesquisas futuras são necessárias para perspectivas de alternativa para uso odontológico.

Palavras-chave: *Candida*. Candidíase bucal. Fitoterapia. Hidrogeis. Testes de Toxicidade Aguda.

DEVELOPMENT OF HYDROGEL INCORPORATED INTO THE EXTRACT OF *Byrsonima gardneriana* (A. JUSS) FOR THE TREATMENT OF ORAL CANDIDOSIS

ABSTRACT

This study aimed to develop a hydrogel based on Pluronic® F127 (PF127) incorporated into the extract of *Byrsonima gardneriana* (A. Juss), analyzing, *in silico*, the theoretical toxicity and pharmacological and pharmacokinetic activities of major compounds of the extract, *in vitro*, physicochemical properties and anti-*Candida* activity of the formulations and, *in vivo*, acute oral toxicity and aneugenic and clastogenic potential. The *in silico* assay using two major compounds in the extract (L-Pyroglutamic acid and octanoic acid, ethyl ester) was performed using the PASS online, Moliispiration and ADMETSar softwares. The PF127-based hydrogel was developed in an ice bath with a concentration of 20% of the polymer (HP) and the incorporation of *B. gardneriana* extract (HBG). The physicochemical properties of centrifugation resistance, pH, preliminary stability, spreadability and viscosity were analyzed. The anti-*Candida* potential was evaluated through antifungal activity on planktonic cells of *C. albicans* (ATCC 10231). In addition, *in vivo* tests were performed with animal models through acute oral toxicity and aneugenic and clastogenic potential in mice. Data were analyzed using Mann-Whitney, Wilcoxon, Student's t and one-way ANOVA tests followed by Tukey's post-test ($\alpha = 0.05$). The results showed that both compounds investigated, *in silico*, showed antibacterial and antifungal properties, possibly exhibiting the ability to undergo absorption through the blood-brain barrier and the human intestine. Theoretically, they are weak inhibitors of the human Ether-à-go-go-Related Gene (HERG), non-toxic by the AMES test, prone to biodegradation and with category III acute oral toxicity. Regarding the *in vitro* tests, when analyzing the physicochemical properties, HP and HBG did not present, after centrifugation, precipitates, phase separation, color change, odor and pH, which were, respectively, 6.7 and 5.75. There was no statistically significant difference in spreadability or between the pH of the samples in the preliminary stability test. Furthermore, when analyzing the viscosity, HP and HBG behaved as non-Newtonian fluids. HBG showed a reduction of 3 log₁₀ when compared to the growth control, representing a microbial reduction of 99.9% on *C. albicans*. As for the animal model, no signs of toxicity were observed in the macroscopic and histopathological exams, with no morbidity or mortality among the animals. In the micronucleus test, it was observed that, when comparing the HP and HBG groups, there was no statistically significant difference in the micronucleus count in erythrocytes. It is concluded that major compounds of *B. gardneriana* extract demonstrated possible pharmacological and pharmacokinetic properties, in addition to low theoretical toxicity. HBG showed important admissible physicochemical properties for a drug of topical application in the oral mucosa and anti-*Candida albicans* activity, showing no signs of acute oral toxicity in mice, in addition to suggesting the absence of aneugenic and clastogenic effects. Therefore, future research is necessary for alternative perspectives for dental use.

Keywords: *Candida*. Candidiasis, oral. Phytotherapy. Hydrogels. Toxicity Tests, Acute.

1 INTRODUÇÃO

A incidência de infecções fúngicas varia de acordo com condições socioeconômicas, regiões geográficas, hábitos culturais e o número de indivíduos portadores de fatores de risco para adquiri-las (GIACOMAZZI et al., 2016). Todavia, dados epidemiológicos para infecções fúngicas são notoriamente escassos pois essas costumam ser mal diagnosticadas (BROWN et al., 2012), outrossim, a maioria delas não se apresenta como doenças notificáveis (FIRACATIVE, 2020).

As candidoses têm sido reconhecidas, ao longo da história humana, como a "doenças dos doentes", caracterizando a natureza patogênica oportunista do microrganismo *Candida* (WILLIAMS et al., 2011). São causadas por espécies do gênero *Candida*, considerado o segundo agente de infecção fúngica mais numeroso no mundo (BROWN et al., 2012). A *Candida albicans* é a espécie mais prevalente (GARCIA-CUESTA; SARRION-PÉREZ; BAGÁN, 2014; PEIXOTO et al., 2014), entretanto, nas últimas décadas, tem sido observado significativo aumento de outras espécies não-*albicans* cada vez mais implicadas em processos infecciosos (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

As infecções fúngicas são de grande preocupação na Odontologia, visto que os pacientes podem apresentá-las de forma superficial ou sistêmica, o que torna o quadro mais grave (TELLES; KARKI; MARSHALL, 2017). A candidose oral pode ser classificada em cinco categorias clínicas: pseudomembranosa, eritematosa, atrófica crônica, queilite angular e hiperplásica crônica (PATEL, 2022). É importante destacar que as manifestações orais são idênticas, independentemente da espécie causadora (VILA et al., 2020).

Com o aumento contínuo na incidência de infecções por *C. albicans* e resistência ao número relativamente limitado de antifúngicos disponíveis, a perspectiva de prevenir a transição de *C. albicans* de comensal para patogênica, evitando assim a candidose, está se tornando cada vez mais desejada (SULTAN et al., 2019). Infelizmente, o arsenal de agentes antifúngicos eficazes permanece muito limitado (CESARE et al., 2020), seja de medicamentos sistêmicos ou tópicos contendo antifúngicos, como: fluconazol, anfotericina B, miconazol, nistatina e clotrimazol. O tratamento é relativamente fácil, todavia podem existir efeitos adversos, ameaça de uso excessivo e desenvolvimento de resistência (PATEL, 2022).

As plantas são uma importante fonte de compostos bioativos e esses podem ser fontes renováveis de agentes fungicidas e bactericidas (ZUBAIR et al., 2013). Nesse contexto, várias abordagens foram desenvolvidas, sendo o uso de Insumos Farmacêuticos Ativos Vegetais (IFAV) e os estudos *in silico docking* molecular os mais pesquisados (VANDEPUTTE et al., 2012).

No entanto, das aproximadamente 422.000 espécies de plantas em todo o mundo, estima-se que apenas uma pequena porção (1% -10%) do número total estimado de medicamentos fitoterápicos derivados dessas espécies foram examinados para propriedades antimicrobianas (CHEESMAN et al., 2020). Apesar da taxa crescente de infecções fúngicas e da disponibilidade limitada de medicamentos antifúngicos eficazes, apenas alguns novos antifúngicos foram desenvolvidos no mercado nos últimos anos (SEYEDJAVADI et al., 2021).

Dentre as inúmeras espécies existentes, ressalta-se a *Byrsonima gardneriana* (A. Juss), do gênero *Byrsonima*, família Malpighiaceae, conhecida popularmente como murici-pitanga. As espécies desse gênero têm sido investigadas quanto a sua ação contra microrganismos implicados na etiologia de doenças gastrointestinais e de pele, apresentando resultados promissores na maioria dos estudos (GUILHON-SIMPLICIO, DE MENESES PEREIRA, 2011). Tem sido descrita na literatura, embora em poucos relatos, com atividade antioxidante, antibiótica e antifúngica sobre espécies de *Candida* (MELO et al., 2016; ROLIM et al., 2013; SILVA et al., 2015).

Em estudo anterior foi observado que o extrato etanólico de *B. gardneriana* apresentou atividade antifúngica contra cepas do gênero *Candida*, sendo classificado como fungistático, além de baixa atividade hemolítica, sem atividade oxidante sobre eritrócitos humanos e atividade antioxidante frente a ação de espécies reativas de oxigênio, além disso, foi realizada a prospecção fitoquímica, por meio da Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas, sendo considerados como substâncias majoritárias encontradas o Ácido Piroglutâmico; Eucaliptol e Ácido Octanóico (SOUZA-MELO et al., 2021).

Idealmente, novos agentes antifúngicos devem ter uma atividade de amplo espectro, sendo alvo-específicos com múltiplos mecanismos de ação sem resistência cruzada entre as espécies fúngicas (SEYEDJAVADI et al., 2021). É imperioso destacar que os produtos naturais fornecem a base para a grande maioria das terapias anti-infecciosas atualmente em uso clínico (DA et al., 2019). Entretanto, os extratos secos

apresentam baixos níveis de solubilidade, estabilidade e adesividade na mucosa oral, o que torna inviável a sua administração (WANG et al., 2014).

Nesse contexto, Hidrogéis (HGs) têm sido amplamente estudados como uma forma farmacêutica para incorporação de Insumo Farmacêutico Ativo Vegetal (IFAV), uma vez que fornecem dois benefícios vitais para a administração: liberação sustentada do medicamento e maior tempo de retenção local. Os HGs podem ser desenvolvidos utilizando copolímeros triblocos disfuncionais (HO-PEO-PPO-PEO-OH), conhecidos por Pluronic® (BATRAKOVA & KABANOV, 2008), propriedades como hidrofiliabilidade, flexibilidade e elasticidade os tornam adequados para usos difundidos na distribuição e direcionamento de medicamentos, engenharia de tecidos, medicina regenerativa, separação de macromoléculas e tecnologia de células encapsuladas (FATHI et al., 2015).

O aprisionamento de um IFAV em um sistema de gelificação termossensível é uma abordagem potencial a ser usada para administração *in situ* devido à fácil aplicação da formulação e liberação controlada do fármaco retido (GIULIANO et al., 2020).

Portanto, com base no exposto, a pesquisa tem como objetivo desenvolver um hidrogel à base de PF127 incorporado ao extrato de *Byrsonima gardneriana* (A. Juss), analisando, *in silico*, *in vitro* e *in vivo*, suas propriedades físico-químicas, atividade anti-*Candida* e toxicidade.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Considerações sobre candidose oral

Os fungos causam mais de um bilhão de infecções de pele, mais de 100 milhões de infecções de mucosa, 10 milhões de alergias graves e mais de um milhão de mortes a cada ano (GOW; NETEA, 2016). Uma característica amplamente difundida é a capacidade desses microrganismos de alterar sua morfologia em resposta a estímulos ambientais, além disso, pode haver variação entre as linhagens das células, o que pode desempenhar um papel importante na capacidade de fungos patogênicos humanos sobreviverem e causarem doenças no hospedeiro (FERNANDES; CARTER, 2020).

A *C. albicans* é um fungo dimórfico que pode se apresentar em forma de levedura ou em forma de hifas (GIANNINI; SHETTY, 2011). A primeira está associada à corrente sanguínea e doenças sistêmicas, enquanto as hifas são mais hábeis em penetrar no tecido e, portanto, são responsáveis por infecções nas mucosas (KONG et al., 2016). A conversão do estado blastoconidia para o estado de hifa instigada por fatores locais e sistêmicos do hospedeiro causa invasão tecidual e infecção clínica (PATEL, 2022).

O papel de destaque desse microrganismo tanto no meio comunitário quanto no hospitalar se deve ao seu alto potencial patogênico (ANGELI et al., 2021). Quando se torna um patógeno ocorre o sobrecrecimento na pele e nas superfícies mucosas, disseminando-se na corrente sanguínea e colonizando em órgãos sólidos (KIM, 2016), sendo assim, o epitélio da mucosa é destruído pela sua proliferação excessiva ocorrendo a candidose (ZHOU; HUA; LIU, 2017).

A candidose é um problema muito comum na população, com múltiplas áreas do corpo podendo ser afetadas (HELLSTEIN; MAREK, 2019). As espécies de *Candida* são microrganismos comensais da cavidade oral, sendo caracterizadas como patógenos oportunistas podendo causar candidose oral quando surgem condições adequadas (SERRA et al., 2020).

As formas de manifestação clínica da candidose são basicamente constituídas por três subtipos: mucosa, cutânea e sistêmica. A mucosa acomete as mucosas orofaríngea, esofágica e vulvovaginal; a cutânea acomete a pele e anexos e a sistêmica é a infecção disseminada conhecida como candidemia (PAPON et al., 2013; PEIXOTO et al., 2014). A imunidade do hospedeiro é o fator mais importante na colonização da cavidade oral por *Candida* (PATEL, 2022).

A candidose oral é a infecção mais comum que afeta a mucosa oral, sobretudo em pacientes imunocomprometidos seja por apresentarem doenças sistêmicas como HIV/Aids, câncer e diabetes; por estarem em uso de medicamentos por tempo prolongado, como corticosteroides e antibióticos; em tratamento antineoplásico como quimioterapia e radioterapia na região de cabeça e pescoço; como também àqueles que apresentam fatores predisponentes locais como o uso de prótese dentária (ARENDRUP, 2010; BROWN et al., 2012; FARAH; LYNCH; MCCULLOUGH, 2010; KONG et al., 2015; LALLA; PATTON; DONGARI-BAGTZOGLU, 2013).

Os pacientes com candidose oral podem ser assintomáticos ou queixar-se de uma sensação de queimação ou ardência na boca, tendo apresentação clínica variável que inclui tanto a presença de formas eritematosas quanto brancas (GIANNINI; SHETTY, 2011). Os principais tipos são pseudomembranosa, hiperplásica crônica, queilite angular, glossite romboide mediana, eritematosas aguda e crônica, atrófica, mucocutânea crônica e candidose crônica multifocal (MILLSOP; FAZEL, 2016; TELLES; KARKI; MARSHALL, 2017; WILLIAMS et al., 2011).

O tratamento para candidose oral é baseado principalmente em fármacos antifúngicos (MUNDULA et al., 2019), sendo as infecções por *Candida* frequentemente restabelecidas logo após o tratamento (KONG et al., 2016). Atualmente, quatro classes de antifúngicos são utilizadas na prática clínica. São elas: polienos, que destroem o ergosterol nas membranas das células fúngicas; azóis, que inibem a lanosterol 14 α -desmetilase (enzima que converte lanosterol em ergosterol); análogos de pirimidina, que convertem a citosina desaminase em 5-fluorouracil (antimetabólito que dificulta a síntese de RNA e DNA); equinocandinas, que inibem a β -(1,3)-D-glucano sintase (ZIENTAL et al., 2021). Todavia, as recorrências são muito comuns, considerando-se a etiologia multifatorial das candidoses além do uso generalizado de fungicidas que tem levado ao desenvolvimento de espécies resistentes (ROCHA et al., 2014).

As infecções causadas por esses microrganismos resistentes muitas vezes não respondem mais ao tratamento convencional, prolongando assim a duração da doença relacionada à infecção (DARTEVELLE et al., 2018). Apesar da disponibilidade de antifúngicos para tratar essa infecção, o uso frequente desses medicamentos pode levar ao desenvolvimento de resistência medicamentosa neste fungo (PATEL, 2022).

2.2 Resistência microbiana

A resistência clínica é a incapacidade de erradicar uma infecção fúngica de um paciente, mesmo que tenha sido administrado um fármaco antifúngico com atividade *in vitro* contra o fungo. A resistência micológica é a capacidade do fungo de crescer na presença de fármacos antifúngicos que, de outra forma, os matariam ou limitariam seu crescimento *in vitro* (PRISTOV; GHANNOUM, 2019).

A resistência intrínseca à terapia antifúngica observada em algumas espécies está se tornando um grande problema no manejo das infecções por *Candida* (SANGUINETTI; POSTERARO; LASS-FLÖRL, 2015). As cepas de *Candida* resistentes a medicamentos representam uma ameaça aos pacientes infectados e têm impactos clínicos em todo o mundo (PRISTOV; GHANNOUM, 2019).

Uma vez que a habitação microbiana natural existente é interrompida, em caso de presença de fatores de risco predisponentes, como sistema imunológico do hospedeiro comprometido e outros estresses ambientais que podem incluir mudanças no pH, disponibilidade de nutrientes, temperatura e exposição a produtos químicos antimicrobianos, a microbiota pode evoluir para patógenos oportunistas (CHANDA et al., 2017). A *C. albicans* adquire resistência aos antifúngicos devido a mutações em genes, cujas funções são diminuir os subprodutos tóxicos para alterar o local de ligação a um medicamento, aumentar a quantidade de enzimas alvo, ou para bombear o medicamento para fora da célula (KIM, 2016).

O surgimento de resistência aos medicamentos a qualquer classe limita gravemente a terapia porque há poucas opções de tratamento disponíveis (PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017). Essa é uma questão de preocupação por causa do número limitado de classes de fármacos visando diferentes componentes fúngicos (MAUBON et al., 2014). Desse modo, esse surgimento de cepas resistentes aos antifúngicos mais utilizados constitui-se uma considerável ameaça à saúde pública (ANGELI et al., 2021).

Com a resistência aos antifúngicos estabelecida, obtém-se desfechos clínicos mais desfavoráveis, como infecções avançadas durante o tratamento e aumento dos custos com a saúde (SANGUINETTI; POSTERARO; LASS-FLÖRL, 2015). Constituindo-se de um problema crescente, refletindo numa perspectiva incerta do uso de antimicrobianos no futuro (ANIBAL et al., 2010). Sendo assim, a situação, provavelmente, será melhorada apenas pela descoberta e introdução de novos e seguros

agentes antifúngicos (WONG et al., 2014). Por tais motivos, na última década, esforços científicos notáveis têm sido dedicados à descoberta e desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, que permitam ultrapassar os limites terapêuticos atuais (ANGELI et al., 2021).

2.3 Uso de plantas medicinais na Odontologia

A resistência microbiana, toxicidade a curto e longo prazo, efeitos adversos e efeitos colaterais, altos custos para o usuário final, comprometimento da sustentabilidade com produção industrial em grande escala são muitos dos fatores que fazem com que se acredite que a busca por novas modalidades de tratamento não deva cessar (FREIRES; ROSALEN, 2016). Terapias alternativas potenciais incluem o uso de novos princípios ativos obtidos de diferentes fontes gerais, como produtos naturais, agentes sintéticos ou materiais poliméricos que foram mostrados para ser ativo *in vitro* (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013).

Partindo-se do princípio de que a humanidade, para curar seus males, sempre utilizou elementos medicamentosos encontrados na natureza (FEITOSA et al., 2016), visto que muitas plantas medicinais proporcionam alívio de sintomas comparáveis aos dos agentes medicinais convencionais (ORLANDI et al., 2011), destaca-se que essas são consideradas como uma terapêutica alternativa na atenção primária à saúde, de modo que seja empregado o conhecimento etnofarmacológico, além de desempenharem um papel importante na biossíntese de produtos naturais (TRENTIN et al., 2013).

Todavia, embora o interesse científico por extratos derivados de plantas tenha aumentado nos últimos anos, o conhecimento sobre as propriedades biológicas de inúmeras plantas permanece limitado (ANGELI et al., 2021). Além disso, é imperioso destacar que as pessoas os usam sem cautela porque acreditam que esses tratamentos alternativos não apresentam riscos ou nenhuma possibilidade de reações alérgicas ou outros efeitos adversos, pois são provenientes de fontes naturais (MARTÍNEZ; GÓMEZ; OH, 2017).

O uso de plantas medicinais na Odontologia ou de produtos obtidos a partir delas ainda é escasso, entretanto pode ser considerado como instrumento de apoio em algumas doenças da cavidade oral como cárie dental, doença periodontal e candidose oral (CASTILHO; PARDI; MURATA, 2007; OLIVEIRA et al., 2007). Essa escassez de produtos pode ser explicada por testes químicos inconclusivos, insuficiência de ensaios

clínicos ou mal concebidos, falta de experiência multidisciplinar e trabalho colaborativo, bem como de parceria e investimento da indústria neste setor (FREIRES; ROSALEN, 2016). Isso pode se justificar em decorrência ser porque os compostos de plantas geralmente requerem efeitos combinatórios complexos entre os componentes para sinergizar a atividade do composto bioativo (CHEESMAN et al., 2020).

Ainda assim, apesar do pequeno número de novos produtos, as pesquisas estão sendo realizadas e diversos estudos avaliam o efeito de derivados de plantas medicinais com potencial anti-*Candida*.

2.4 *Byrsonima gardneriana* (A. Juss)

No Nordeste brasileiro, existem várias espécies do gênero *Byrsonima* que são principalmente conhecidas pela utilização dos seus frutos na alimentação e pelo emprego com fins medicinais. A *Byrsonima gardneriana* (A. Juss), pertencente à família Malpighiaceae, é uma alternativa para os produtores devido às inúmeras utilizações de seus frutos na fabricação de produtos diversos, além de um ótimo potencial alimentar animal. Outrossim, é utilizada na medicina popular, como laxante e no combate à tosse e bronquite; a casca serve como antitérmico, e sua adstringência pode ser responsável por uma possível atividade antimicrobiana, a exemplo de infecções na pele (GUIMARÃES; SILVA, 2008; MENDES et al., 1999; SOUZA et al., 2019).

Em um estudo sobre plantas medicinais na vegetação da caatinga do Nordeste brasileiro, Albuquerque et al. (2007) observaram, por meio de uma revisão da literatura, de 21 estudos com um universo de 556 plantas, dentre as quais a *Byrsonima gardneriana* (A. Juss) apresentava como indicações terapêuticas, de acordo com as comunidades tradicionais, em doenças como gripe e inflamações na garganta, além de atuar na diluição do sangue.

David et al. (2007) avaliaram 32 extratos de plantas da região semiárida nordestina brasileira, Caatinga, por meio de atividades de eliminação pela espectrofotometria utilizando 1,1-difenil-2-picril-hidrozil (DPPH), atividade antioxidante por meio do teste de branqueamento de β -caroteno e testes de letalidade do camarão salino (BST), e os resultados mostraram que a *B. gardneriana* teve atividade de eliminação mais alta (IC50 mais baixo) com 0,3 mg/mL e em relação a atividade antioxidante ficou atrás apenas da *Passiflora cincinnata* (70,1) e da *Chamaecrista repens* (68,3), com 63,2.

Além de estudos etnobotânicos é possível identificar como atividades farmacológicas de *Byrsonima gardneriana* na literatura, boa atividade antioxidante por meio de métodos de atividade sequestradora do radical e Capacidade Oxidante Equivalente ao Trolox (ROLIM et al., 2013), atividade antibiótica em biofilmes do trato gastrointestinal (SILVA et al., 2015) e atividade antifúngica sobre leveduras de *C. albicans* (MELO et al., 2016).

2.5 Formulações farmacológicas em hidrogel

Na cavidade oral, seja qual for o produto terapêutico utilizado, é difícil manter a concentração terapêutica devido ao fluxo constante de saliva. Para tanto, é importante que as concentrações subterapêuticas tenham algum efeito sobre a patogenicidade das células de *Candida* sobreviventes, proporcionando benefício adicional (PATEL, 2022). Os hidrogéis são um tipo particularmente atraente de sistema de administração de fármacos e têm sido usados em muitos ramos da medicina (LI; MOONEY, 2016).

Pertencentes ao grupo dos Géis, que consistem na dispersão de um sólido (resinas, polímeros e derivados de celulose) em um líquido (geralmente água ou mistura álcool/água), formando um excipiente transparente ou translúcido, os hidrogéis são substâncias hidrofílicas (FERREIRA, 2010). São definidos como dois ou múltiplos sistemas de componentes que consistem em uma rede tridimensional de cadeias de polímero e água que preenche o espaço entre macromoléculas (AHMED, 2015). O alto teor de água (normalmente 70–99%) fornece semelhança física com os tecidos e pode dar aos hidrogéis excelente biocompatibilidade e capacidade de encapsular facilmente fármacos hidrofílicos (LI; MOONEY, 2016).

Os hidrogéis naturais são constituídos principalmente de materiais à base de polímeros naturais, como proteínas e polissacarídeos. Os hidrogéis sintéticos são feitos de polímeros sintéticos, como poli (ácido acrílico) (PAA), poli (etilenoglicol) (PEG), poli (álcool vinílico) (PVA), poli(acrilamida) (PAAm) e polipeptídeos (ZHU, 2010). Como propriedades físicas atrativas dos hidrogéis, destacam-se a sua porosidade e a liberação sustentada do fármaco carregado (NARAYANASWAMY; TORCHILIN, 2019).

Os hidrogéis têm sido utilizados como andaimes para fornecer integridade estrutural e volume para organização celular e orientação morfogênica, servir como barreiras de tecidos e bioadesivo, atuar como depósitos de fármacos, entregar agentes bioativos que estimulam o processo reparador natural e encapsular e entregar células

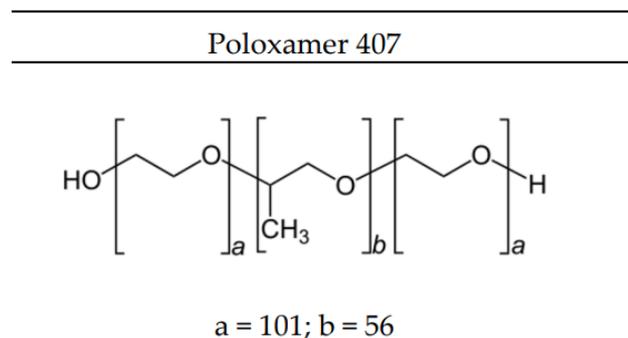
(SLAUGHTER et al., 2009). A arquitetura 3D porosa dos hidrogéis torna-os capazes de conter grandes quantidades de moléculas de água e sofrer mudanças macroscópicas em dimensões que conferem alguns graus de flexibilidade semelhantes aos tecidos naturais (FATHI et al., 2015).

Os hidrogéis são excelentes candidatos como carreadores para liberação de fármacos, peptídeos e proteínas porque sua estrutura tridimensional permite o controle topológico do transporte de solutos (SHARPE et al., 2014), apresentando fácil preparação devido ao seu comportamento líquido à temperatura ambiente, depois gelificação após a administração acompanhada por um tempo de residência prolongado no local de aplicação e uma liberação sustentada do fármaco (GIULIANO et al., 2018). Outrossim, estudos recentes têm demonstrado resultados promissores de atividade anti-*Candida* na utilização de hidrogéis a partir de óleos essenciais (SERRA et al., 2020; TOMCZYKOWA et al., 2018).

De acordo com Batrakova e Kabanov (2008) uma classe de copolímeros triblocos disfuncionais (HO-PEO-PPO-PEO-OH), conhecidos por Pluronic® são promissores para o desenvolvimento de hidrogéis reversíveis de sol-gel têm atraído a atenção para práticas biomédicas e aplicações farmacêuticas devido à solubilidade dos constituintes, biocompatibilidade com sistemas biológicos e fácil administração de formulações farmacêuticas (RUSSO; VILLA, 2019). Não são tóxicos ou irritáveis e representam um excelente excipiente, compatível com muitas substâncias diferentes e útil para diferentes fins, por exemplo, aumentando a solubilidade de fármacos pouco solúveis em água (CRISTIANO et al., 2020).

2.6 Hidrogéis de PF127

O polímero P407 (Figura 1), também conhecido pelos nomes comerciais Pluronic® F-127 e Synperonic®^{PE}/F127 (PF127), é um tensoativo anfifílico não iônico da família tribloco-copolímero de poloxâmeros (GIULIANO et al., 2019), tem propriedades únicas de sensibilidade ao calor, ressalta-se que existe como um líquido em baixa temperatura e como um gel semi-sólido em alta temperatura (YANG et al., 2020).

Figura 1 - Estrutura química do F127

Fonte: Giuliano et al (2020)

Uma variedade de Pluronic está disponível no mercado, diferindo pelo peso molecular de blocos de construção e a razão entre hidrofóbicos e unidades hidrofílicas (GIOFFREDI et al., 2016). As formulações contendo o copolímero em uma concentração de 15 a 30% *p/p* são caracterizadas por gelificação à temperatura corporal. Hidrogéis termossensíveis à base de Poloxâmero 407 têm sido utilizados para a entrega de compostos ativos caracterizados por diferentes propriedades físico-químicas, com o objetivo de obter uma liberação controlada (GIULIANO et al., 2018). A temperatura de gelificação e a viscosidade da solução de polímero dependem da concentração de PF127 (DONG et al., 2018).

O PF127 mais utilizado e estudado, na concentração de 20% *p/p* em água, é capaz de converter a solução em um gel transparente aquecendo o sistema da temperatura ambiente (25 °C) até a temperatura corporal (perto de 37 °C) (RUSSO; VILLA, 2019). Pode ser usado como solubilizante, emulsificante ou estabilizador e pode ser administrado por vias locais. Devido à sua solubilidade, biocompatibilidade e não irritação a biofilmes, o gel termossensível à base de PF127 pode ser aplicado a sistemas de liberação de fármacos nas mucosas (CHEN et al., 2021).

Muitas investigações experimentais mostraram as aplicações potenciais dos géis PF127 como sistemas locais de liberação de fármacos (GIULIANO et al., 2019), em diversas áreas médicas com formulações oftalmológicas (NAGAI et al., 2020), dermatológicas (WRÓBLEWSKA; SZYMAŃSKA; WINNICKA, 2021), nasais (DESHKAR; JADHAV; SHIROLKAR, 2021), retais (LIU et al., 2017), dentre outras.

Formulações orais contendo PF127 também foram investigadas. Sheshala et al (2018) avaliaram formulações de gel *in situ* contendo moxifloxacina para tratamento da doença periodontal. Dentre os resultados, as formulações com PF127 e quitosana, demonstraram, além de propriedades físico-químicas satisfatórias, promissora eficácia

antimicrobiana contra *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Streptococcus mutans*, caracterizando alternativas viáveis para o tratamento periodontal.

Chaudhary e Verma (2014) estudaram o efeito de géis *in situ* contendo aciclovir para o tratamento da infecção por herpes simples em mucosa oral. Foram desenvolvidos diversos géis com concentrações diferentes de PF127, carbopol 934 e HPMC (hidroxipropilmetilcelulose) e do aciclovir. O estudo de liberação de fármacos de todas as formulações mostrou propriedades de liberação sustentada e os autores concluíram que esse tipo de formulação é um importante candidato ao tratamento local da infecção por herpes simples oral, melhorando a adesão do paciente.

Nasra et al (2017) desenvolveram um gel de curcumina *in-situ* para o tratamento de bolsas periodontais. Para tal, foi utilizado 30% de PF127, 1% de carbopol P934 e variações nas porcentagens de curcumina, além do desenvolvimento, foi avaliada a eficácia clínica da formulação. Os resultados demonstram que, adjuvante ao tratamento mecânico em pacientes com periodontite, o gel de curcumina a 2% *in situ* pode ajudar na redução clínica significativa da profundidade de sondagem, índice de sangramento e menor extensão do biofilme.

2.7 Estado da arte

O extrato etanólico de *B. Gardneriana* tem sido estudado pelo grupo de pesquisa na Universidade Estadual da Paraíba. Até então, identificou-se a composição fitoquímica do extrato etanólico de folhas, por meio de Cromatografia Gasosa, em que foi observada a presença de compostos bioativos com atividade farmacológica importante. Os resultados dessa análise mostraram que os compostos encontrados com maior probabilidade foram o Ácido Piroglutâmico (90,77%); Eucaliptol (89,61%) e Ácido Octanoico (76,22%), sendo essa a porcentagem de probabilidade pela biblioteca dos espectros de massa.

Em relação a ação biológica do extrato, foram realizadas análises de atividade anti-*Candida*, toxicidade e sua propriedade antioxidante. Quanto a atividade anti-*Candida*, foram utilizadas cepas de referência *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida glabrata* (ATCC 90030), *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida tropicalis* (ATCC 750) e três isolados clínicos de *C. albicans*, tendo o extrato demonstrado valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 125 µg/mL para maioria das cepas avaliadas, destacando-se o valor da Concentração Fungicida Mínima (CFM) maior que

1.000µg/mL para todas as cepas. Além disso, também foi observado o potencial anti-*Candida* do extrato sobre a cinética de crescimento de *C. albicans*.

O extrato etanólico de *B. gardneriana* apresentou, para todos os tipos sanguíneos avaliados, baixo potencial hemolítico. Na presença de fenilhidrazina, o extrato não apresentou efeito oxidante para os tipos sanguíneos investigados. Quando na presença de espécies reativas de oxigênio o extrato teve atividade antioxidante nas concentrações de 31 e 62 µg/mL.

Neste sentido, agora busca-se o desenvolvimento de um hidrogel de PF127 à base do extrato de *B. gardneriana* a fim de se avaliar, além de propriedades físico-químicas, sua atividade anti-*Candida* e toxicidade em animais para uma possível aplicação futura na Clínica Odontológica.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

- Desenvolver um hidrogel à base de Pluronic® F127 (PF127) incorporado ao extrato de *Byrsonima gardneriana* (A. Juss), analisando, *in silico*, a toxicidade teórica e atividades farmacológica e farmacocinética de compostos majoritários do extrato, *in vitro*, propriedades físico-químicas e atividade anti-*Candida* das formulações e, *in vivo*, toxicidade oral aguda e potencial aneugênico e clastogênico.

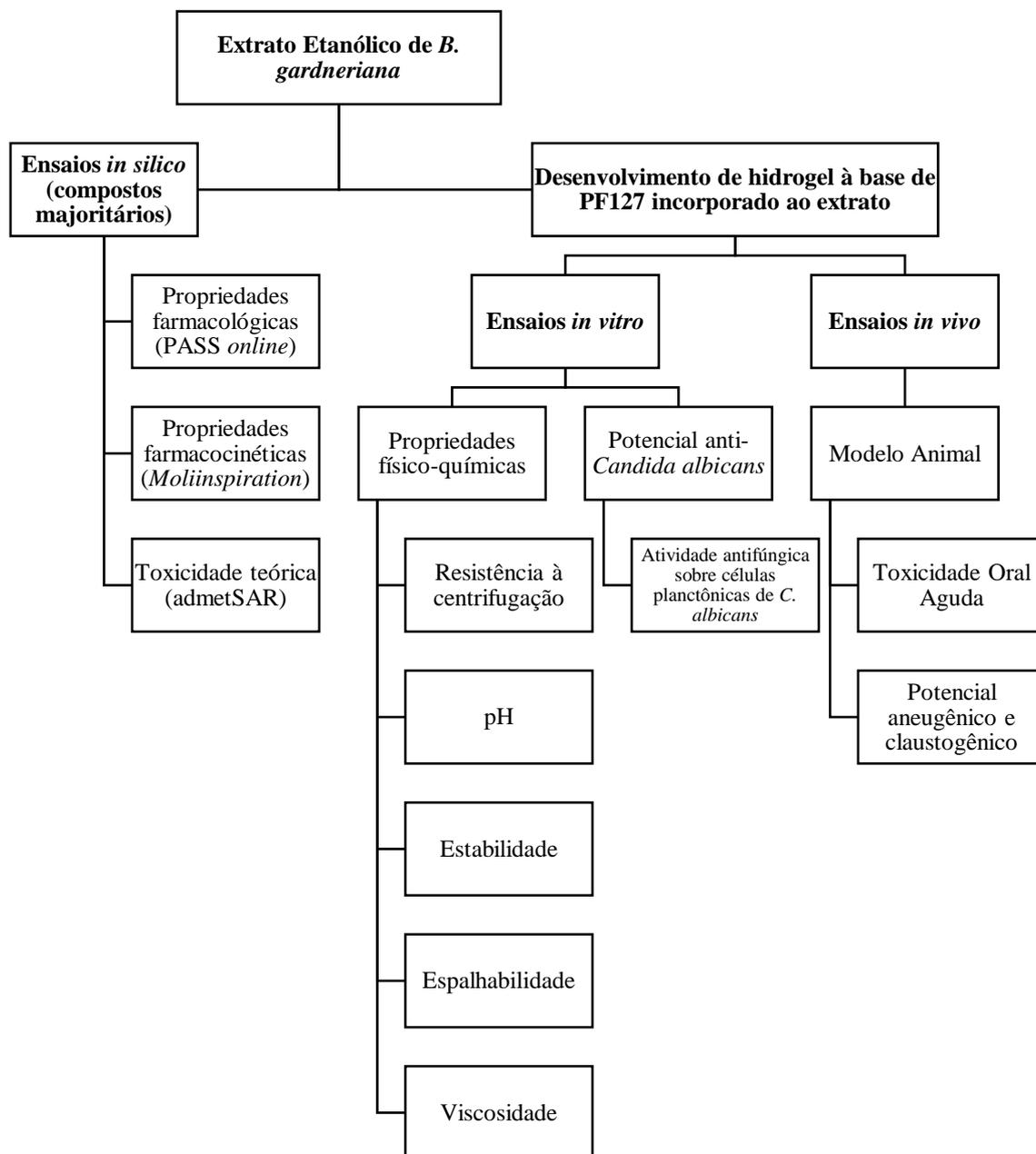
3.2 Objetivos específicos

- Verificar por meio de ensaio *in silico* o potencial biológico de compostos majoritários do extrato etanólico de *Byrsonima gardneriana* quanto a toxicidade teórica e atividades farmacológica e farmacocinética;
- Desenvolver um hidrogel com à base de PF127 incorporado ao extrato de *Byrsonima gardneriana* (HBG) para o tratamento de candidose oral;
- Caracterizar o hidrogel incorporado ao extrato de *Byrsonima gardneriana* por meio da realização de análises físico-químicas aplicadas em formulações farmacêuticas como: resistência à centrifugação, pH, Estabilidade, Espalhabilidade e Viscosidade;
- Avaliar a atividade antifúngica do HBG sobre células planctônicas de *Candida albicans*;
- Avaliar a toxicidade aguda, *in vivo*, do HBG em camundongos;
- Avaliar o potencial clastogênico e aneugênico do HBG por meio do teste de micronúcleo em eritrócitos de camundongos.

4 Materiais e Métodos

As etapas que serão utilizadas como metodologia neste estudo estão distribuídas no fluxograma representado na Figura 2.

Figura 2 - Fluxograma das etapas da pesquisa.



Fonte: Elaboração própria.

4.1 Delineamento do estudo

Tratou-se de uma pesquisa aplicada, quantitativa do tipo experimental, *in silico*, *in vitro* e *in vivo* que adotou um modelo de pesquisa animal de camundongos, sendo caracterizado como estudo *in vivo* controlado e randomizado.

4.2 Aspectos éticos

Uma vez que essa Pesquisa envolveu modelos de experimentação animal foi submetida à análise da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual da Paraíba e aprovada pelo parecer nº 021/2021 em 10 de dezembro de 2021 (ANEXO A).

4.3 Local de estudo

Os ensaios *in silico* foram realizados no Laboratório de Bioquímica da Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Patos, Paraíba.

Os testes *in vitro* para o desenvolvimento da formulação hidrogel e análise das suas propriedades físico-químicas e atividade antifúngica foram realizados no Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos (LDCPF) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campus I, Campina Grande, Paraíba.

Os testes *in vivo* (avaliação de toxicidade oral aguda e do potencial clastogênico e Aneugênico), foram realizados no Centro Bioterismo da Universidade Estadual da Paraíba e no Laboratório de Histopatologia Oral do Departamento de Odontologia da UEPB, Campus I.

4.4 Material vegetal

O material vegetal, partes aéreas, de *Byrsonima gardneriana* (A. Juss), foi coletado na região semiárida do município de Serra Branca, Estado da Paraíba, nordeste do Brasil, mesorregião da Borborema e microrregião do Cariri Oriental. Coordenadas do Georreferenciamento Latitude: 07° 29' 00"S e Longitude: 36° 39' 54"W. O espécime de *Byrsonima gardneriana* (A. Juss) encontra-se depositado na Coleção do Herbário Professor Lauro Pires Xavier do Departamento de

Sistemática e Ecologia da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa/PB, e identificado com o número de voucher: AGRA 947.

As folhas de *B. gardneriana* foram secas em estufa à temperatura média de 45°C durante quatro dias. Após a secagem, o material vegetal foi submetido a um processo de pulverização em moinho mecânico tipo Harley, obtendo-se 4kg de pó seco. Após isso o material foi submetido à maceração com etanol a 95%, durante 72h. Após extração, a solução extrativa foi concentrada em rotaevaporador sob pressão reduzida à temperatura média de 45°C, obtendo-se o extrato etanólico bruto (ROLIM et al., 2013).

A presente pesquisa foi registrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimentos Tradicionais Associados do Ministério do Meio Ambiente sob o número AF1E759.

4.5 Ensaio *in silico*

Tendo em vista os estudos prévios, mencionados anteriormente no item 2.7, a partir do extrato etanólico de *B. gardneriana*, nos quais se observou, por meio da Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM), compostos majoritários do extrato, realizou-se o ensaio *in silico* a partir desses compostos.

Para os ensaios *in silico* foram utilizados os *softwares* PASS online, Moliinspiration e admetSAR dos compostos Ácidos L-Piroglutâmico e octanoico, éster etílico, utilizando o Código *Smiles* de cada um dos compostos para utilização nos *softwares*.

Para previsão do espectro de atividade e análise das propriedades farmacológicas dos compostos Ácidos L-Piroglutâmico e octanoico, éster etílico foi utilizado o *software* PASS online (<http://www.pharmaexpert.ru/passonline/>), com o objetivo de avaliar o potencial biológico geral de uma molécula orgânica quando em contato com o organismo humano, sendo possível fornecer previsões simultâneas de muitos tipos de atividades biológicas com base na estrutura dos compostos orgânicos, que refletem os resultados de interação do composto com várias entidades biológicas. Os parâmetros da ação biológica dos compostos foram interpretados conforme a classificação: Pa (probabilidade de ser ativo) e Pi (probabilidade de ser inativo), estimando a categorização de um composto potencial em ser pertencente à subclasse de compostos ativos ou inativos, respectivamente (SRINIVAS et al., 2014).

Na análise dos parâmetros farmacológicos, foi avaliada a biodisponibilidade oral teórica do produto, pela “Regra dos Cinco” de Lipinski, que estabelece que pelo menos três de quatro requisitos devam ser apresentados para que o composto possua uma boa biodisponibilidade. Assim, para que compostos sejam absorvidos, devem possuir peso molecular 500 daltons (Da), coeficiente de partição octanol/água calculado (cLogP) 5, número de aceptores de ligação hidrogênio (nALH) 10 e número de grupos doadores de ligação hidrogênio (nDLH) 5 (LIPINSKI et al., 2001). A esta predição, foi empregado o programa *Molinspiration Cheminformatics* (<http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>).

Para a análise da toxicidade teórica, foram avaliados os parâmetros ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade) usando o programa admetSAR por meio do endereço: (<http://lmmd.ecust.edu.cn:8000/>).

4.6 Ensaios *in vitro*

4.6.1 Preparação do hidrogel de PF127 com e sem o extrato de *B. gardneriana*

O hidrogel foi obtido pelo método a frio, levando em consideração a proporção peso/volume em porcentagem (Quadro 1). Sendo assim, uma solução 20% (m/v) de Pluronic® F-127 (Sigma-Aldrich Brasil, Lote # BCCC2327, Cotia, São Paulo, Brasil) foi preparada dissolvendo F127 em água ultrapurificada (temperatura de 10 °C em q.s.p. 100 mL).

Quadro 1 - Composição das amostras dos hidrogeis estudados.

| | HP Puro | HBG 1% | HBG 2% | HBG 3% | HBG 4% |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| PF127 | 20% | 20% | 20% | 20% | 20% |
| Extrato etanólico de <i>B. gardneriana</i> | ----- | 1% do polímero | 2% do polímero | 3% do polímero | 4% do polímero |

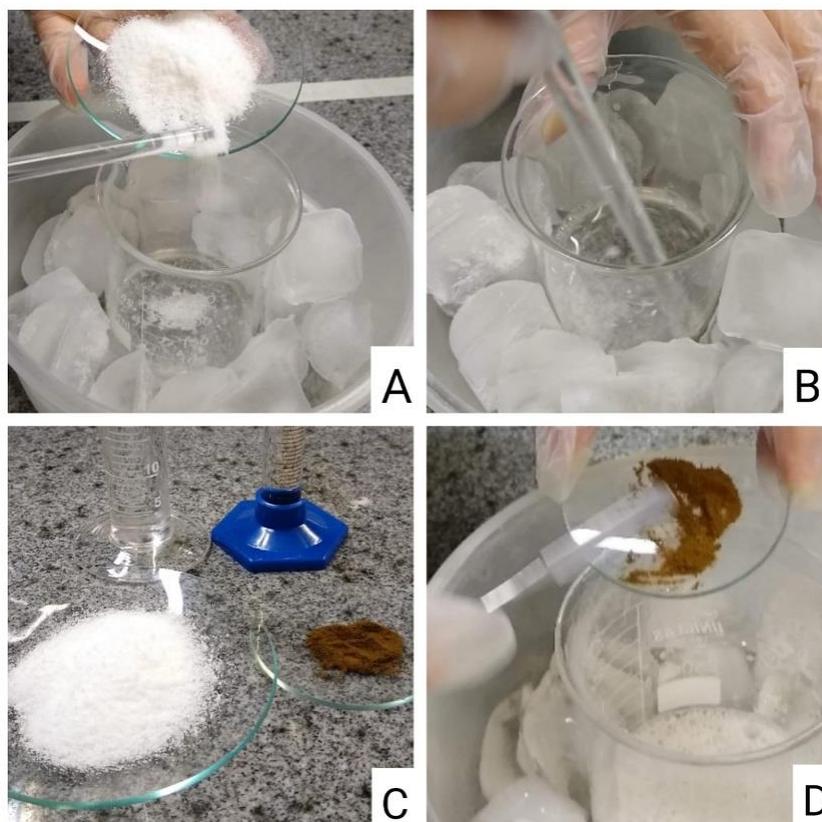
Fonte: Elaboração própria.

A Figura 3 apresenta a preparação das amostras, onde a mistura foi mantida sob pulverização em banho de gelo até completa dispersão do PF127. As soluções obtidas foram armazenadas sob refrigeração (GIOFFREDI et al., 2016). Posteriormente, diferentes proporções (m/v) do extrato seco (1%, 2%, 3%, 4%) foram adicionadas na solução de F127, com o intuito de verificar a capacidade máxima de incorporação do hidrogel sem alterar suas características físico-químicas. Para tanto, utilizou-se agitação mecânica (Agitador Magnético SL-92 – SOLAR) por 2 minutos, seguido de banhos

ultrassônicos (Lavadora Ultrassônica, UNIQUE) com três ciclos de 10 minutos. Todas as amostras obtidas forma mantidas sob refrigeração.

Tendo em vista que, na maior proporção do extrato 4% (8 mg/ml) houve a completa dispersão, todos os testes do HBG foram realizados com essa proporção.

Figura 3 - Desenvolvimento das formulações hidrogel. A: Dispersão do polímero em água deionizada. B: Agitação para completa dissolução em banho de gelo. C: Proporção polímero/extrato etanólico de *B. gardneriana*. D: Incorporação do extrato ao polímero.



Fonte: Elaboração própria.

4.6.1.1 Propriedades físico-químicas

4.6.1.1.1 Resistência à Centrifugação

A determinação da resistência à centrifugação das amostras, foi realizada de acordo com o Guia de estabilidade de cosméticos da ANVISA (BRASIL, 2004a). Após a formulação, as amostras passaram por teste de centrifugação (Zentrifugen Mikro 220R, HETTICH), alocadas em tubos *ependorfs*, em 3000 rpm por 30 minutos, foram analisados aspectos, como: presença de precipitados, cor, odor e pH.

4.6.1.1.2 pH

A aferição do pH foi realizada utilizando fitas de medição com escala colorimétrica (Macherey-Nagel). O teste fornece fitas impregnadas com um reagente que indica por meio de escala de cores qual a classificação da amostra em um intervalo de classificação de pH 0 (ácido) a 14 (alcalino). As amostras foram colocadas em recipiente de vidro e uma fita foi mergulhada por cinco segundos na amostra, essa fita foi então comparada com a escala e a cor resultante da leitura.

4.6.1.1.3 Estabilidade preliminar

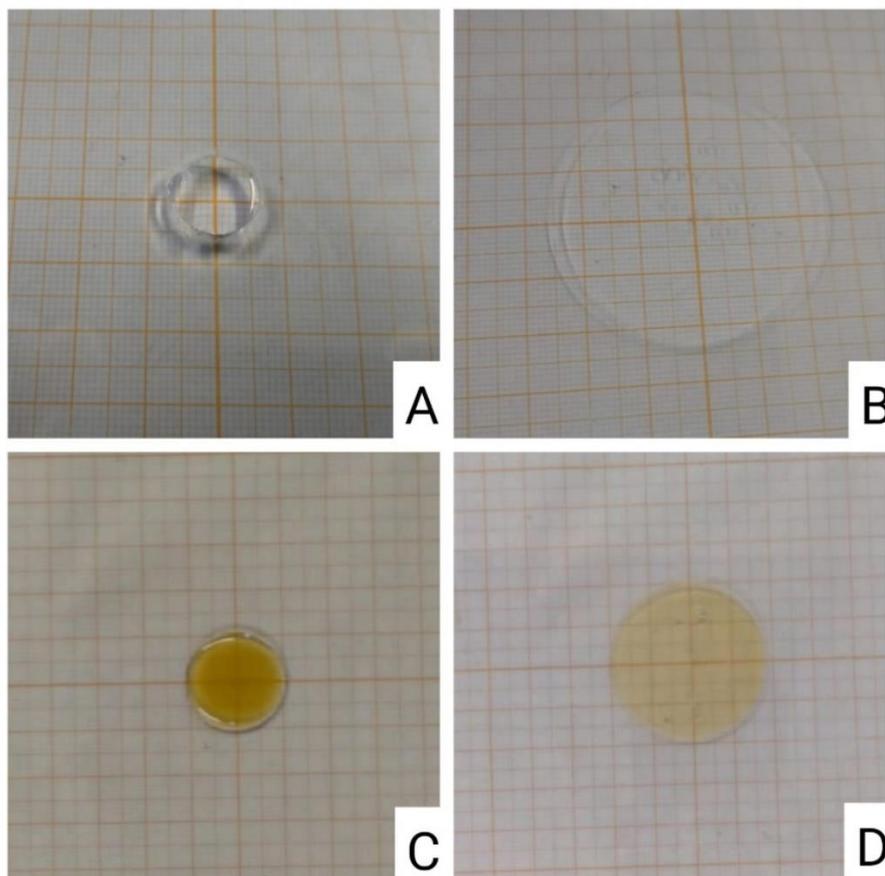
As amostras de HBG e HP foram submetidas à permanência nas temperaturas padronizadas por período de 12 dias correspondente a 6 ciclos, com temperaturas correspondentes a $T=5 \pm 2^\circ\text{C}$ (Geladeira) e $T=37 \pm 2^\circ\text{C}$ (Estufa), onde 24 horas em cada temperatura corresponde a um ciclo. Após cada ciclo foram observadas características organolépticas (aspecto, cor e odor) e o pH das amostras (BRASIL, 2004a).

4.6.1.1.4 Espalhabilidade

Para a determinação da espalhabilidade utilizou-se uma placa-molde circular de vidro com orifício central de 1,2 cm de diâmetro que foi colocada sobre uma placa suporte de vidro posicionado sobre papel milimetrado (Figura 4). A amostra foi introduzida no orifício e nivelada com auxílio de espátula, de forma a preencher o orifício. A placa móvel foi retirada e sobre a amostra foi colocada uma placa de vidro de peso conhecido. Após um minuto foi realizada a leitura dos diâmetros abrangidos pela amostra em posições opostas, com auxílio do papel milimetrado e depois calculado o diâmetro médio. Este procedimento foi repetido acrescentando-se, ao todo, dez placas de vidro com pesos pré-determinados (235,82g, 238,50g, 241,24g, 227,02g, 238,27g, 225,72g, 238,82g, 239,53g, 238,28g e 235,51g) em intervalos de um minuto de uma placa para outra (CORDEIRO et al, 2013 com adaptações).

Para o cálculo da espalhabilidade foi utilizada a equação $Ei = d^2 \times \pi 4$, onde: Ei = espalhabilidade da amostra para um determinado peso i (mm^2); d^2 = diâmetro médio (mm) (KNORST, 1991).

Figura 4 - Obtenção da espalhabilidade das amostras estudadas (HP e HBG) sobre papel milimetrado. A e C: Preenchimento do orifício central da placa com o HP e HBG, respectivamente. B e D: Obtenção do diâmetro do HP e HBG após colocação de placa.



Fonte: Elaboração própria.

4.6.1.1.5 Viscosidade

As determinações de viscosidade foram realizadas a partir das metodologias propostas por Patias et al. (2016) e Zortéa et al. (2011) com adaptações. Empregou-se o Viscosímetro Digital de Brookfield, *Viscolead One* (Fungilab®), no qual as amostras foram medidas por velocidade de rotação de eixo metálico, com cone coaxial *spindle* R7. Foi utilizado aproximadamente 40mL de cada amostra (HP e HBG), nas temperaturas de $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, tendo como princípio a velocidade de rotação de eixos imersos na amostra, com valores de velocidade de rotação do *spindle* de 2, 3, 4, 5, 6, 10, 12, 20, 30, 50, 60 e 100 rpm. Os resultados corresponderam à média de três determinações, por meio do registro com valor em centipoise (cP), de acordo com a capacidade de leitura do aparelho.

4.6.2 Potencial anti-*Candida*

4.6.2.1 Microrganismo utilizado

Foi utilizada a cepa da *American Type Culture Collection* (ATCC) de *Candida albicans* (ATCC 10231) provenientes da Fundação Oswaldo Cruz/RJ e estocadas no Laboratório de Histopatologia Oral do Departamento de Odontologia da UEPB.

4.6.2.2 Reativação dos microrganismos

As cepas de coleção foram reativadas a partir de sua cultura original em meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose (Kasvi, São José dos Pinhais, Brasil) e incubada a 37 °C, por 24 h, em atmosfera de aerobiose. Este procedimento foi realizado 24 horas antes de todos os preparos de inóculo.

4.6.2.3 Preparo do inóculo

O preparo do inóculo para os testes de suscetibilidade foi realizado seguindo as recomendações do protocolo M27-A3 para leveduras (CLSI, 2008). O inóculo fúngico foi padronizado em espectrofotômetro (Modelo SP-22, Biospectro, Curitiba, Brasil) com comprimento de onda de 530nm e absorbância entre 0,08–0,1, correspondendo à concentração de 5×10^6 UFC/mL.

4.6.2.4 Atividade antifúngica sobre células planctônicas de *C. albicans*

Para o teste da atividade antifúngica sobre células planctônicas de *C. albicans* foi utilizada a metodologia preconizada por Santos et al (2022) com adaptações. Foram investigadas as seguintes substâncias: extrato etanólico de *B. gardneriana*, HBG, HP, além do controle positivo (Nistatina) e veículos (DMSO e PBS), Controle de viabilidade dos microrganismos (controle de crescimento com ausência de antimicrobiano), controle de esterilidade do meio de cultura (ausência de microrganismos nos poços). Uma alíquota de 100 µl das amostras foi adicionada a cada poço de uma microplaca de poliestireno de 96 poços e 100 µl do inóculo foi adicionado aos poços da linha A. Em seguida, foi realizada diluição seriada com 20 µL da linha A para as demais linhas da microplaca (B-H). Por fim, essas foram colocadas em estufa a 37 °C por 24 horas. Após a incubação, placas Petri contendo Agar Sabouraud Dextrose, foram divididas em oito seções (Figura 5) para semeadura das alíquotas por amostras, onde 20 µL de cada

alíquota foram espalhados sobre as superfícies das placas e essas foram incubadas aerobicamente a 37°C por 24 horas. Após esse período, foram contadas as unidades formadoras de colônias, sendo esses valores transformados em \log_{10} . O experimento foi realizado em triplicata.

Figura 5 - Placas com ASD divididas em oito seções para a semadura das alíquotas.



Fonte: Elaboração própria.

4.7 Ensaios *in vivo*

4.7.1 Utilização de Modelo Animal

Para a realização do ensaio *in vivo* de Toxicidade aguda e potencial Aneugênico e clastogênico foram utilizados camundongos *Mus musculus* da linhagem Swiss, idade de cinco a sete semanas, pesando entre 25-35 g, provenientes do Centro de Bioterismo da UEPB, mantidos a uma temperatura de 23 ± 1 °C, ciclo de claro e escuro de 12h e alimentados com ração Purina tipo *pellets* e água *ad libitum*. Os camundongos foram distribuídos nos diferentes grupos experimentais ao acaso e durante o experimento alojados em gaiolas (542 cm²) do tipo microisoladoras com grade, tampa e sistema de válvulas para insuflamento e exaustão de ar (Figura 6). Tais gaiolas apresentam forração com maravalhas de *Pinus*, esterilizada por radiação gama.

Figura 6 - Camundongos alojados em gaiolas microisoladoras com grade.



Fonte: Elaboração própria.

4.7.1.1 Distribuição da Amostra

A distribuição da amostra pelos grupos está demonstrada no Quadro 2.

Quadro 2 - Distribuição da amostra em grupos para realização dos testes de Toxicidade Aguda e Potencial Aneugênico e Clastogênico.

| Toxicidade Aguda 6 animais (fêmeas) | Potencial Aneugênico e Clastogênico 18 animais (9 machos e 9 fêmeas) |
|---|---|
| Grupo I: Grupo experimental, composto por três animais que receberão por via oral o HBG. | Grupo I: Grupo experimental, composto por seis animais que receberam, por via oral, doses de 2.000 µg/mL do HBG. |
| Grupo II: Grupo Controle, composto por três animais que receberam por via oral o veículo (HP). | Grupo II: Grupo Controle, composto por seis animais que receberam por via oral o veículo (HP). |
| ----- | Grupo III: Controle positivo, composto por seis animais que receberam administração do agente mutagênico ciclofosfamida numa dose de 50 mg/Kg de peso do animal. |

Fonte: Elaboração própria.

4.7.1.2 Toxicidade aguda in vivo do HBG em camundongos

O grupo experimental foi tratado com HBG, os animais receberam uma dose de 2.000 mg/kg. No grupo controle foi utilizado o veículo - HP (hidrogel sem incorporação do extrato de *B. gardneriana*) (OECD, 2001). Ambas as substâncias foram administradas por via oral. Cada grupo foi composto por três animais (fêmeas), totalizando seis animais.

Sinais de toxicidade incluindo tempo de aparecimento, progressão e reversibilidade destes sintomas foram observados, além disso parâmetros como alteração da locomoção, frequência respiratória, diarreia, sialorreia, convulsões,

hiperexcitabilidade do sistema nervoso central, contorções abdominais, número de animais mortos com possível causa de morte e respectivos exames histopatológicos foram investigados. A observação ocorreu durante as primeiras 24 horas, nos períodos de 0, 15, 30 e 60 minutos. Após o término da primeira hora, o acompanhamento ocorreu a cada 60 minutos até se completarem as quatro horas. Durante os 14 dias após administração do HP e do HBG, foram realizadas observações diárias, sempre no mesmo horário do início do experimento (BRASIL, 2013).

O consumo de comida e água foi monitorado diariamente, e o peso corporal registrado no dia 0 (antes da dosagem) e dia 14. Após 14 dias, os animais foram eutanasiados pela administração de anestésico em excesso (30 mg/kg de xilazina e 300 mg/kg de cetamina), por via intraperitoneal. Após a eutanásia, foi realizada a excisão do coração, estômago, fígado, baço e rins (cortado por incisão sagital).

Os órgãos foram examinados macroscopicamente, a ressecção foi feita com consecutiva pesagem dos órgãos excisados e fixação em solução de formaldeído a 10%, após 72 horas foi realizada a clivagem para processamento histopatológico. Os índices de órgãos foram calculados de acordo com a equação: índice = peso do componente (g)/ peso do animal (g) x 100. Após o processamento histopatológico, houve a observação qualitativa de presença ou ausência de sinais de toxicidade, como: hiperemia, presença de infiltrado inflamatório, binucleação, sinusóides dilatados e megalocitose (no fígado), mineralização da luz tubular (nos rins) (MAGALHÃES, 2018).

4.7.1.3 Potencial Aneugênico e Clastogênico - Teste do micronúcleo

Foram utilizados três grupos experimentais e em cada um desses grupos foram utilizadas amostras contendo três machos e três fêmeas, totalizando 18 animais. A utilização dessa quantidade de animais é feita considerando-se os princípios dispostos na segunda versão do Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos (BRASIL, 2013).

O grupo teste foi tratado a partir da administração por via oral nas concentrações de 2.000 µg/mL do HBG (BRASIL, 2004). O grupo controle negativo recebeu tratamento apenas com a solução dispersante da amostra (HP) e o grupo controle positivo recebeu administração do agente mutagênico ciclofosfamida numa dose de 50mg/Kg de peso do animal.

Vinte e quatro horas após os tratamentos os animais foram anestesiados intraperitonealmente (Xilazina 10mg/kg e Cetamina 100 mg/kg) e uma amostra de sangue foi coletada por via intracárdica para o preparo de lâminas. Posteriormente, os animais foram eutanasiados pela administração de anestésico em excesso (300 mg/kg de cetamina) associado a 30 mg/kg de xilazina, por via intraperitoneal.

As lâminas com amostras de sangue foram preparadas por esfregaço e coradas com corante panóptico para observação da presença ou ausência de micronúcleos nos eritrócitos de cada animal. Foram contados cerca de 1.000 eritrócitos por animal. As lâminas foram observadas ao microscópio óptico no aumento de 100x para a contagem dos micronúcleos (HAYASHI et al., 2007 com adaptações), sendo contados em quatro campos por lâmina. Os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão em comparação com o grupo controle positivo.

4.8 Análises estatísticas

Os dados foram analisados a partir de estatística descritiva e inferencial. As variáveis foram analisadas descritivamente a partir medidas de tendência central e dispersão e tiveram sua normalidade verificada a partir do teste de Shapiro-Wilk, bem como por meio da análise visual de histograma. Com exceção da variável consumo de ração, potencial Aneugênico e Clastogênico, viscosidade e atividade anti-*Candida*, as demais variáveis apresentaram distribuição não-gaussiana. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar as variáveis estabilidade, consumo de água, pesos dos órgãos, índices dos órgãos e ganho de peso entre os grupos estudados. O teste t de Student foi empregado para comparar a espalhabilidade e o consumo de ração. A comparação entre o peso inicial e final em cada grupo foi realizada a partir do teste de Wilcoxon. Para a comparação do Potencial Aneugênico e Clastogênico e Atividade Anti-*Candida* foi aplicado a análise de variância de 1 via (ANOVA *one-way*) com teste a posteriori de Tukey. Para a comparação da viscosidade foi aplicado o teste T para amostras independentes. Todas as análises foram realizadas utilizando o *software Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS para Windows, versão 25.0, IBM Corp., Armonk, NY, EUA) com um nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

Ensaio *in silico*

A Tabela 1, demonstra os resultados obtidos no teste executado por meio do programa PASS *online*. Pode-se verificar probabilidades do ácido L-Piroglutâmico e do ácido octanoico, éster etílico com propriedades antibiótica, antibacteriana e antifúngica.

Tabela 1 - Potencial biológico previsto para os Ácido L-Piroglutâmico e Ácido octanoico, éster etílico em alvos moleculares. Análise pela ferramenta PASS *online*.

| Composto | Pa | Pi | Atividade |
|--------------------------------|-------|-------|---|
| Ácido L-Piroglutâmico | 0,333 | 0,048 | Antibacteriana |
| | 0,226 | 0,008 | Antibacteriana, Oftalmica |
| | 0,205 | 0,027 | Antibiótica |
| | 0,022 | 0,003 | Antibiótico semelhante ao Carbapenem |
| | 0,428 | 0,010 | Antibiótico semelhante ao glicopeptídeo |
| | 0,006 | 0,005 | Antibiótica tipo Penicilina |
| | 0,023 | 0,018 | Antibiótica tipo Quinolona |
| | 0,021 | 0,009 | Antibiótica beta-lactâmica |
| | 0,230 | 0,118 | Antifúngica |
| | 0,119 | 0,024 | Potenciador Antifúngico |
| Ácido octanoico, éster etílico | 0,237 | 0,091 | Antibacteriana |
| | 0,186 | 0,022 | Antibacteriana, Oftalmica |
| | 0,104 | 0,078 | Antibiótica |
| | 0,396 | 0,050 | Antifúngico |
| | 0,068 | 0,013 | Antifúngico (<i>Pneumocystis</i>) |

Legenda: Pa= Probabilidade de ser ativo; Pi= Probabilidade de ser inativo

Fonte: Elaboração própria.

A Tabela 2 demonstra as propriedades moleculares dos compostos estudados. Os resultados obtidos permitem concluir que tais compostos apresentam boa biodisponibilidade teórica por via oral, visto que, de acordo com a “Regra dos cinco” do Lipinski, é preciso atender 3 dos 4 parâmetros (miLogP, MM, nALH e nDLH) para ser possível apresentar boa disponibilidade oral. Ambos os compostos responderam aos parâmetros dessa regra: (1) a peso molecular é inferior a 500, (2) o octanol/coeficiente de partição da água (LogP) < 5, (3) há menos de cinco doadores de ligações de hidrogênio (grupos NH e OH), e, (4) há menos de dez aceptores de ligações de hidrogênio (notavelmente átomos de N e O) (GHANNAY; KADRI; AOUADI, 2020), não apresentando nenhuma violação à mesma.

Tabela 2 - Propriedades moleculares do ácido L-piroglutâmico e do Ácido octanoico, éster etílico, calculadas no *software Moliinspiration*

| Composto | miLogP | MM | nALH | nDLH | nviolações | TPSA | nrotb |
|---------------------------------------|--------|--------|------|------|------------|-------|-------|
| Ácido L-Piroglutâmico | -2.40 | 129.12 | 4 | 2 | 0 | 66.40 | 1 |
| Ácido octanoico, éster etílico | 3.70 | 172.27 | 2 | 0 | 0 | 26.30 | 8 |

Legenda: miLogP – coeficiente de partição octanol/água; MM- peso molecular; nALH – número de grupos; aceptores de ligação de hidrogênio; nDLH – número de grupos doadores de ligação de hidrogênio; nviolações – número de violações; TPSA – área superficial polar topológica; nrotb – número de bandas rotáveis

Fonte: Elaboração própria.

As Tabelas 3 e 4 demonstram os resultados obtidos por meio do *software* admetSAR no que diz respeito à absorção, distribuição, metabolismo e toxicidade.

Com relação à absorção, esse teste revelou que o ácido L-Piroglutâmico e o ácido octanoico, éster etílico possivelmente apresentam capacidade de sofrer absorção através da barreira hematoencefálica e do intestino humano, o que sugere boa absorção, provável permeabilidade intestinal e boa solubilidade. Dentre eles, apenas o ácido octanoico, etil ester possui permeabilidade teórica em Caco-2 (Células de adenocarcinoma de cólon humano). Ambos compostos não foram classificados como substrato ou como inibidor para as isoformas CYP450 avaliadas, possuindo baixa promiscuidade. Quanto à distribuição, ambos compostos demonstraram localização subcelular em mitocôndria (Tabela 3).

No que tange os parâmetros de toxicidade, o teste demonstrou que, teoricamente, ambos compostos são fracos inibidores do gene codificador de canais de potássio (HERG), não tóxicos pelo teste AMES, propensos à biodegradação e com categoria III de toxicidade oral aguda (DL50 maior que 500 mg/kg e inferior a 5000 mg/kg). Com relação ao potencial carcinogênico apenas o ácido octanoico, etil ester apresentou tal classificação (Tabela 3). Além disso, o ácido L-piroglutâmico e o ácido octanoico apresentaram como possíveis doses DL50 teórica para toxicidade aguda em ratos 2.081 mol/kg e 1.4690 mol/kg, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 3 - Classificação das propriedades ADMET (*Software* admetSAR)

| Modelo | Ácido L- Piroglutâmico | P | Ácido octanoico, éster etílico | P |
|---|---------------------------|--------|-----------------------------------|--------|
| Absorção | | | | |
| Barreira hematoencefálica | BBB+ | 0.9612 | BBB+ | 0.9863 |
| Absorção Intestinal Humana | HIA+ | 0.8440 | HIA+ | 0.9942 |
| Permeabilidade Caco-2 | Caco2- | 0.7558 | Caco2+ | 0.8014 |
| Substrato da Glicoproteína P | NS | 0.6844 | NS | 0.7076 |
| Inibidor da Glicoproteína P | NI | 0.9821 | NI | 0.9133 |
| | NI | 0.9970 | NI | 0.8892 |
| Transportador renal de Cátions orgânicos | NI | 0.9233 | NI | 0.8671 |
| Distribuição | | | | |
| Localização subcelular | Mitocôndria | 0.7605 | Mitocôndria | 0.6090 |
| Metabolismo | | | | |
| Substrato CYP450 2C9 | NS | 0.8193 | NS | 0.8704 |
| Substrato CYP450 2D6 | NS | 0.8251 | NS | 0.8921 |
| Substrato CYP450 3A4 | NS | 0.6317 | NS | 0.6433 |
| Inibidor CYP450 1A2 | NI | 0.9641 | NI | 0.5000 |
| Inibidor CYP450 2C9 | NI | 0.9782 | NI | 0.9277 |
| Inibidor CYP450 2D6 | NI | 0.9678 | NI | 0.9225 |
| Inibidor CYP450 2C19 | NI | 0.9812 | NI | 0.9391 |
| Inibidor CYP450 3A4 | NI | 0.9931 | NI | 0.9513 |
| Promiscuidade Inibitória CYP | Baixa | 0.9973 | Baixa | 0.8517 |
| Toxicidade | | | | |
| Inibição do gene codificador de canais de potássio (HERG) | IF | 0.9923 | IF | 0.9293 |
| | NI | 0.9791 | NI | 0.8493 |
| Toxicidade AMES | NT | 0.9497 | NT | 0.9627 |
| Carcinógenos | NC | 0.9744 | C | 0.5754 |
| Toxicidade em peixes | Baixa | 0.9509 | Alta | 0.8533 |
| Toxicidade <i>Tetrahymena Pyriformis</i> | Baixa | 0.9860 | Alta | 0.9498 |
| Toxicidade em abelhas | Baixa | 0.7479 | Alta | 0.7425 |
| Biodegradação | PB | 0.9363 | PB | 0.9370 |
| Toxicidade Oral Aguda | III | 0.8003 | III | 0.8356 |
| Carcinogenicidade (Três classes) | NR | 0.7189 | NR | 0.6625 |

Legenda: P: Probabilidade; NS: Não substrato; NI: Não inibidor; IF: Inibição Fraca; NT: Não Tóxico; NC: Não cancerígeno; C: Cancerígeno; PB: Propenso à biodegradação; NR: Não requerido.

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 4 - Propriedades de regressão ADMET para os ácidos L-Piroglutâmico e Octanoico, éster etílico.

| Modelo | Ácido L-Piroglutâmico | Ácido octanoico, éster etílico |
|---|------------------------|--------------------------------|
| Previsão do perfil ADMET – Regressão | | |
| Absorção | | |
| Solubilidade aquosa | -0.1398 (LogS) | -2.7727 (LogS) |
| Permeabilidade Caco-2 | 0.2383 (LogPapp, cm/s) | 1.2631 (LogPapp, cm/s) |
| Toxicidade | | |
| Toxicidade Aguda em Ratos | 2.081 (LD50, mol/kg) | 1.4690 (LD50, mol/kg) |
| Toxicidade em Peixes | 2.9766 (pLC50, mg/L) | 0.7684 (pLC50, mg/L) |
| Toxicidade <i>Tetrahymena Pyriformis</i> | -1.0440 (pIGC50, ug/L) | 0.1853 (pIGC50, ug/L) |

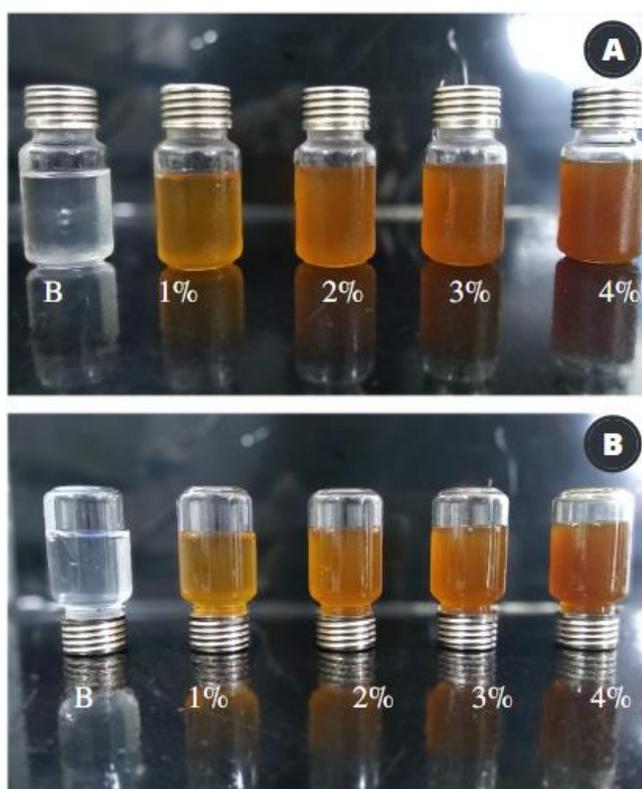
Fonte: Elaboração própria.

Ensaio *in vitro*

Formulação do Hidrogel de PF127 incorporado ao extrato de *B. gardneriana*

As formulações produzidas estão apresentadas na Figura 7.

Figura 7 - Formulações à base de PF127. A: Antes da gelificação. B: Após a gelificação em temperatura ambiente. (B) Branco – Hidrogel PF127 Puro; (1%) – HBG 1%; (2%) – HBG 2%; (3%) – HBG 3%; (4%) – HBG 4%.



Fonte: Elaboração própria.

As formulações não apresentaram precipitados, sendo o Hidrogel à base de PF127 (Puro) transparente e odor característico (Figura 7A). Com relação às características organolépticas, os Hidrogeis incorporados ao extrato de *Byrsonima gardneriana* (HBG) apresentaram cor levemente alaranjada, aspecto gelificado, odor característico, mantendo-se estável macroscopicamente. Durante o período de observação, nenhuma das amostras apresentou alterações quanto a coloração, odor e aspecto. Os HBG obtiveram coloração variando em tons de laranja escuro a depender da quantidade de extrato incorporado. O HBG a 4% apresentou cor laranja-amarronzada.

Pelo fato do PF127 ser termossensível, em temperatura ambiente, todas as formulações gelificaram (Figura 7). Para a análise das propriedades físico-químicas

foram utilizados os hidrogéis Pluronic 20% Puro e incorporado ao extrato etanólico de *B. gardneriana* a 4%.

Teste de Resistência à Centrifugação

O Quadro 3 apresenta os dados referentes ao pH, cor e odor das amostras antes e após a centrifugação.

Quadro 3 - pH, cor e odor de HP20 e HBG antes e após a centrifugação

| Amostra | Antes da centrifugação | | | Após da centrifugação | | |
|---------|------------------------|-----|------|-----------------------|-----|------|
| | pH | Cor | Odor | pH | Cor | Odor |
| HP | 6,7 | SA | AS | 6,7 | SA | SA |
| HBG 4% | 5,75 | SA | AS | 5,75 | SA | SA |

Legenda: SA: Sem Alterações

Fonte: Elaboração própria.

Após o teste de centrifugação as amostras não apresentaram precipitados, separação de fases (coalescência, cremeação ou floculação), alteração de cor, odor, pH. apresentou logo após a preparação.

Cor

A coloração das amostras do HBG e HP20% não sofreram alteração de cor, permanecendo a cor normal.

Odor

As amostras obtiveram odor característico, sem alteração.

Estabilidade

A Tabela 5 demonstra os resultados obtidos no teste de estabilidade preliminar realizado em 6 ciclos, correspondendo cada ciclo a 24 horas na estufa (42 °C) e 24 horas na geladeira (5 °C). É possível observar que não houve alteração quanto a cor, odor ou separação de fase durante os ciclos. Além disso, houve a medição do pH das amostras em cada ciclo. Para tal, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,065$).

Tabela 5 - Estabilidade Preliminar do Hidrogel Pluronic 20% e do Hidrogel incorporado ao extrato de *B. gardneriana* 4% (HBG). Não houve diferença significativa entre os grupos.

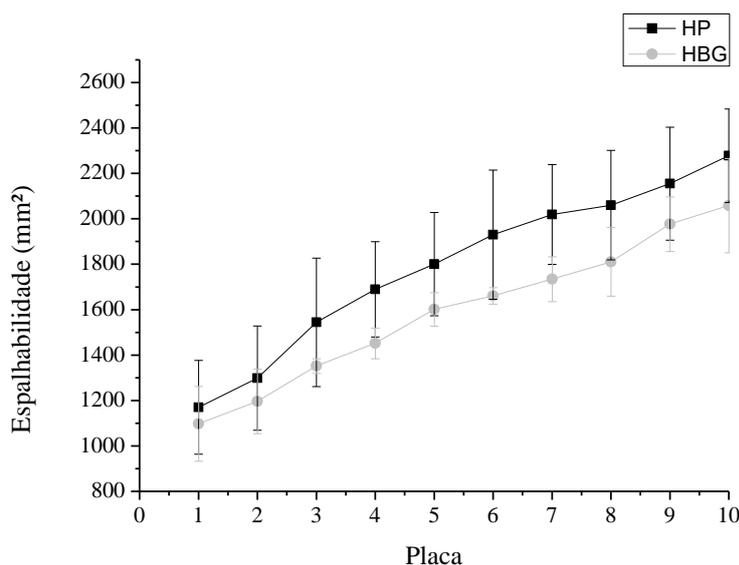
| <i>Amostra</i> | <i>Ciclo</i> | <i>Aspecto Visual</i> | <i>Cor</i> | <i>Odor</i> | <i>pH</i> |
|------------------------------|--------------|-----------------------|------------|-------------|---------------------|
| HP (CONTROLE) | 01 | SA | SA | SA | 6 |
| | 02 | SA | SA | SA | 6,5 |
| | 03 | SA | SA | SA | 6,5 |
| | 04 | SA | SA | SA | 6 |
| | 05 | SA | SA | SA | 6 |
| | 06 | SA | SA | SA | 7 |
| Média ± Desvio-padrão | | | | | 6,33 ± 0,408 |
| HBG (TESTE) | 01 | SA | SA | SA | 6 |
| | 02 | SA | SA | SA | 6 |
| | 03 | SA | SA | SA | 6 |
| | 04 | SA | SA | SA | 5 |
| | 05 | SA | SA | SA | 5 |
| | 06 | SA | SA | SA | 6 |
| Média ± Desvio-padrão | | | | | 5,66 ± 0,516 |

Legenda: SA: Sem alterações.

Espalhabilidade

A Figura 8 é referente aos resultados de espalhabilidade do HP e do HBG.

Figura 8 - Espalhabilidade (mm²) do Hidrogel Pluronic 20% e do Hidrogel incorporado ao extrato de *B. gardneriana* 4% (HBG). Não houve diferença significativa entre os grupos (Teste t de Student- $p=0,209$).

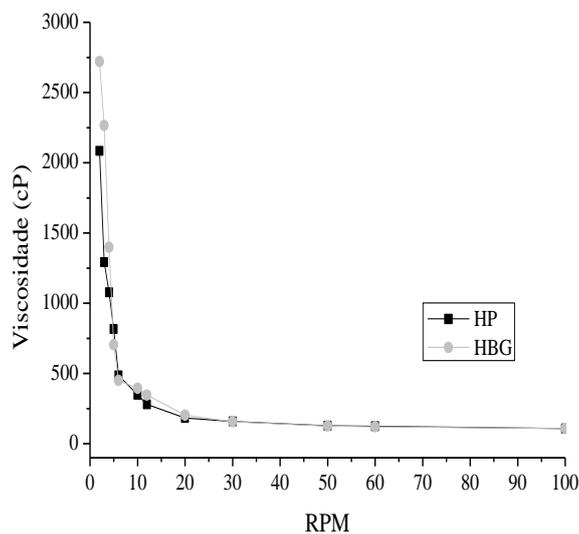


A análise estatística destes resultados não apresentou diferença significativa entre os grupos ($p = 0,209$), o que permite destacar que a adição do extrato de *B. gardneriana* ao hidrogel não alterou a espalhabilidade do hidrogel de PF127 puro.

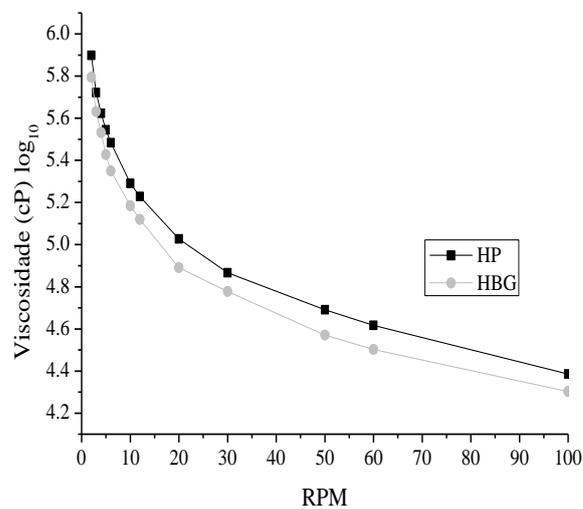
Viscosidade

A viscosidade foi medida por meio de viscosímetro digital com variação na velocidade de rotação. A Figura 9 apresenta as curvas formadas pela relação da viscosidade (cP) com a velocidade de rotação em RPM.

Figura 9 - Curva com comportamento decrescente da Viscosidade (cP) das amostras HP e HBG em 5°C (a) e 30°C (b).



(a)



(b)

A Tabela 6 demonstra a média e desvio-padrão das amostras investigadas em triplicata. Foi possível observar um comportamento semelhante entre as amostras estudadas, ambas diminuíram a viscosidade à medida que a velocidade de rotação do *spindle* aumentou.

Tabela 6 - Valores em média \pm desvio-padrão da Viscosidade (cP) do HP e HBG nas temperaturas de 5°C e 30°C.

| RPM | Amostra | 5°C | | | 30° C | | |
|-----|---------|---------|--------|------|---------------|--------|---------|
| | | Média | DP | p | Média (Log10) | DP | p |
| 2 | HP | 2084,70 | 202,09 | 0,03 | 5,90 | 0,0007 | <0,0001 |
| | HBG | 2719,83 | 276,66 | | 5,79 | 0,0059 | |
| 3 | HP | 1291,67 | 285,00 | 0,01 | 5,72 | 0,0270 | 0,008 |
| | HBG | 2264,63 | 277,21 | | 5,63 | 0,0163 | |
| 4 | HP | 1076,40 | 194,66 | 0,37 | 5,62 | 0,0175 | 0,014 |
| | HBG | 1398,47 | 522,54 | | 5,53 | 0,0339 | |
| 5 | HP | 815,43 | 157,20 | 0,46 | 5,55 | 0,0253 | 0,004 |
| | HBG | 704,73 | 177,51 | | 5,43 | 0,0238 | |
| 6 | HP | 486,63 | 65,26 | 0,46 | 5,48 | 0,0324 | 0,005 |
| | HBG | 449,70 | 44,10 | | 5,35 | 0,0247 | |
| 10 | HP | 348,57 | 69,52 | 0,44 | 5,29 | 0,0402 | 0,55 |
| | HBG | 395,07 | 65,53 | | 5,18 | 0,0551 | |
| 12 | HP | 279,50 | 56,17 | 0,11 | 5,23 | 0,0347 | 0,04 |
| | HBG | 346,90 | 12,75 | | 5,12 | 0,0556 | |
| 20 | HP | 183,37 | 9,26 | 0,06 | 5,03 | 0,0307 | 0,012 |
| | HBG | 202,97 | 9,74 | | 4,89 | 0,0451 | |
| 30 | HP | 158,03 | 16,79 | 0,86 | 4,87 | 0,0318 | 0,169 |
| | HBG | 155,50 | 16,40 | | 4,78 | 0,0860 | |
| 50 | HP | 127,93 | 10,00 | 0,9 | 4,69 | 0,0009 | 0,074 |
| | HBG | 126,53 | 15,45 | | 4,57 | 0,0867 | |
| 60 | HP | 124,07 | 8,70 | 0,77 | 4,62 | 0,0107 | 0,081 |
| | HBG | 120,47 | 18,03 | | 4,50 | 0,0851 | |
| 100 | HP | 108,56 | 8,50 | 0,7 | 4,39 | 0,0277 | 0,179 |
| | HBG | 107,83 | 21,68 | | 4,30 | 0,0849 | |

Legenda: DP – Desvio-padrão. Teste T para amostras independentes.

Fonte: Elaboração própria.

Potencial anti-*Candida albicans*

Atividade antifúngica sobre células planctônicas de *C. albicans*

A Tabela 7 e a Figura 10 apresentam os resultados referentes à atividade antifúngica do HBG.

Tabela 7 - Efeito antifúngico contra *C. albicans* (ATCC 10231) por diferentes tratamentos.

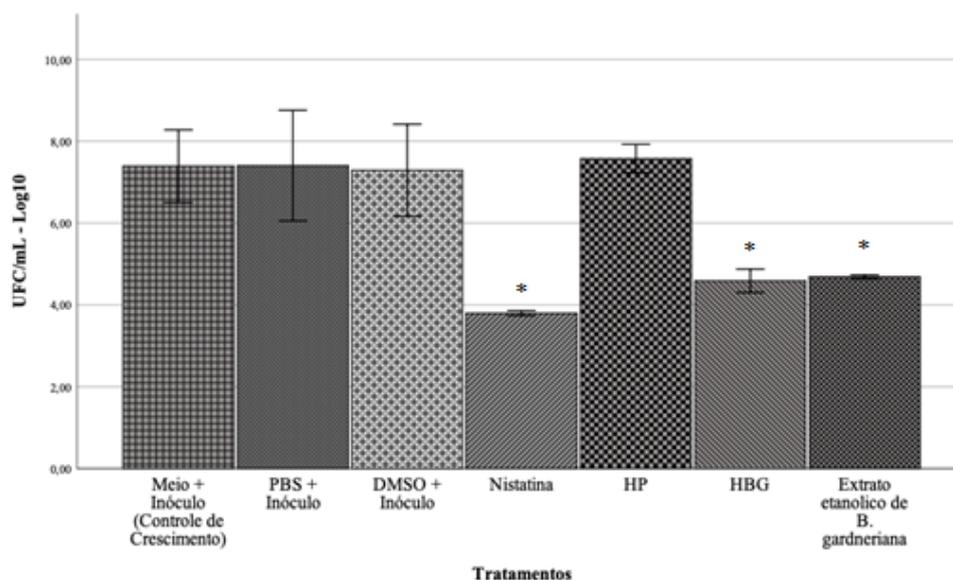
| Atividade Anti- <i>Candida</i> (Log 10 média ± desvio-padrão) | |
|---|---|
| HBG (4,58 ± 0,11) ^{ac} | Meio + Inóculo (7,39 ± 0,35) ^b |
| | PBS + Inóculo (7,40 ± 0,54) ^b |
| | DMSO + Inóculo (7,28 ± 0,45) ^b |
| | Nistatina (3,79 ± 0,02) ^c |
| | Hidrogel HP (7,57 ± 0,14) ^b |
| | Extrato etanólico de <i>B. gardneriana</i> (4,68 ± 0,01) ^a |

*Letras diferentes significam que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Análise por ANOVA *one way* seguido por pós-teste de Tukey, $p < 0,05$.

Fonte: Elaboração própria.

Houve diferença estatisticamente significativa do HBG, da nistatina e do extrato etanólico de *B. gardneriana* quando comparados ao controle de crescimento (Meio + Inóculo) e com os veículos.

Figura 10 - Redução logarítmica entre os grupos quando comparados ao controle de crescimento. (Valores expressos em LogUFC).



Legenda: (*) Diferença estatisticamente significativa quando comparado ao Controle de Crescimento.

Fonte: Elaboração própria.

O HBG apresentou redução de 3 log₁₀ (99,9%) de crescimento microbiano quando comparado ao Controle de Crescimento, assim como o extrato etanólico. O Hidrogel puro HPF127 não apresentou redução logarítmica quando comparado ao controle negativo, dessa forma é possível constatar que foi a adição do extrato ao

polímero que permitiu a redução microbiana. A nistatina apresentou redução microbiana de 4 log₁₀ (99,99%).

Toxicidade Aguda

A toxicidade aguda foi avaliada por meio da ingestão de dose única do HP e do HBG em camundongos fêmeas. Durante 14 dias, os animais foram observados quanto ao comportamento, ingestão de água e ração e ganho de peso ao final do teste. A Tabela 8 apresenta os resultados referentes aos sinais de toxicidade aguda, como: alteração da locomoção, frequência respiratória, diarreia, sialorreia, convulsões, hiperexcitabilidade do sistema nervoso central, contorções abdominais, número de animais mortos com possível causa de morte. É possível observar que ambos os grupos não apresentaram mortalidade, morbidade, comportamento incomum e sinais clínicos adversos em todos os animais.

Tabela 8 - Observação de sinais de toxicidade aguda D0-D14

| Dia | HP (Controle) | HBG (2.000 mg/kg) |
|---------------------------------|----------------------|--------------------------|
| D0 – 15 minutos | SA | SA |
| D0 – 30 minutos | SA | SA |
| D0 – 60 minutos | SA | SA |
| D0 – 2 horas | SA | SA |
| D0 – 3 horas | SA | SA |
| D0 – 4 horas | SA | SA |
| D1 – D14 | SA | SA |
| <i>Número de animais mortos</i> | 0 | 0 |

Legenda: SA (Sem alterações)

Fonte: Elaboração própria

O ganho de peso dos animais está apresentado na Tabela 9, é possível observar que não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o grupo teste. Também não foram encontradas alterações morfológicas externas na textura ou cor desses órgãos quando comparados ao grupo controle.

Tabela 9 - Efeitos do tratamento agudo de HBG na mudança de peso de camundongos fêmeas tratadas. Valores correspondem a Média \pm Desvio-Padrão, comparados ao grupo controle. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

| Grupo | Peso (g) D0 | Peso (g) D14 | Ganho de Peso (g) D14 |
|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|
| HP (Controle) | 28,33 \pm 2,082 | 30,67 \pm 1,155 | 2,33 \pm 1,528 |
| HBG (2.000 mg/kg) | 29,00 \pm 1,00 | 30,66 \pm 2,516 | 1,67 \pm 1,528 |
| p valor | p=0,109* | p=0,180* | p=0,07** |

*Teste Wilcoxon; **Teste Mann-Whitney;

Fonte: Elaboração própria

A Tabela 10 apresenta o consumo de água e ração para as amostras investigadas. É possível observar que houve diferença estatisticamente significativa com relação ao consumo de ração do grupo tratado com HBG (2.000 mg/kg). Em se tratando do consumo de água não houve diferença estatística entre os grupos.

Tabela 10 - Efeitos do tratamento agudo de HBG no consumo diário de água e ingestão de ração de camundongos fêmeas tratadas. Valores correspondem a Média \pm Desvio-Padrão, comparados ao grupo controle. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (p=0,006) com relação à ingestão de ração.

| Grupo | Água (mL) | Ração (g) |
|-------------------|-------------------|---------------------|
| HP (Controle) | 28,57 \pm 5,345 | 18,79 \pm 2,082 |
| HBG (2.000 mg/kg) | 25,71 \pm 6,462 | 16,79 \pm 1,424** |
| p valor | p=0,24* | p=0,006** |

*Teste Mann-Whitney; **Teste T Student

Fonte: Elaboração própria

O coração, estômago, fígado, baço e rins dos animais submetidos foram avaliados macroscopicamente e por meio de exame histopatológico. As Tabelas 11 e 12 demonstram, respectivamente, o efeito dos hidrogéis sobre pesos absoluto e relativo dos órgãos dos animais.

Tabela 11 - Peso absoluto dos órgãos de camundongos fêmeas tratadas por via oral com dose única de 2.000mg/kg.

| Órgão (g) | HP | HBG | p Valor |
|-----------------|-------------------|--------------------|---------|
| Coração | 0,136 \pm 0,152 | 0,143 \pm 0,005 | 0,70* |
| Estômago | 0,433 \pm 0,032 | 0,363 \pm 0,568 | 0,137** |
| Fígado | 2,216 \pm 0,177 | 1,91 \pm 0,228 | 0,147** |
| Baço | 0,203 \pm 0,035 | 0,223 \pm 0,055 | 0,624** |
| Rim 1 | 0,283 \pm 0,015 | 0,2867 \pm 0,152 | 0,802** |
| Rim 2 | 0,276 \pm 0,015 | 0,2767 \pm 0,005 | 1,00* |

Valores expressos em média \pm desvio-padrão. *Teste Mann-Whitney **Teste T Student.

Fonte: Elaboração própria

Os órgãos não apresentaram alterações anatômicas, no entanto, variações estatisticamente significativas apenas no índice do estômago dos animais tratados quando comparados ao grupo controle.

Tabela 12 - Efeitos do tratamento agudo de HBG nos índices dos órgãos (peso relativo) de camundongos fêmeas tratados.

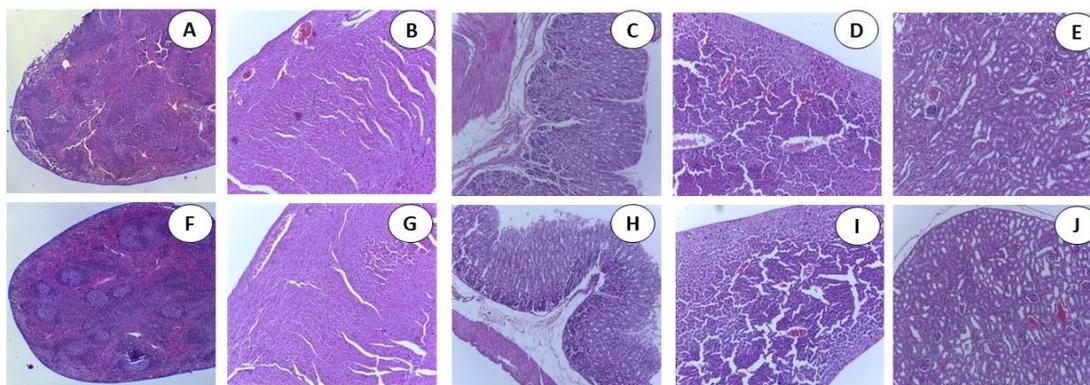
| Índice (g/gX100) | HP | HBG | p Valor |
|--------------------|---------------|----------------|---------|
| Índice Cardíaco | 0,445 ± 0,391 | 0,470 ± 0,058 | 0,564 |
| Índice do Estômago | 1,411 ± 0,052 | 1,179 ± 0,094* | 0,020 |
| Índice Hepático | 7,237 ± 0,689 | 6,248 ± 0,474 | 0,110 |
| Índice do Baço | 0,665 ± 0,134 | 0,721 ± 0,130 | 0,632 |
| Índice Rim 1 | 0,925 ± 0,078 | 0,936 ± 0,027 | 0,836 |
| Índice Rim 2 | 0,902 ± 0,033 | 0,905 ± 0,057 | 0,937 |

Valores expressos em média ± desvio-padrão. Teste T *student*.

Fonte: Elaboração própria

A Figura 11 apresenta as fotomicrografias dos cortes histológicos dos órgãos. É possível observar que não houve sinais de toxicidade aguda nos órgãos investigados.

Figura 11 - Fotomicrografia dos cortes histológicos corados em hematoxilina e eosina sob diferentes condições experimentais, demonstrando ausência de sinais de toxicidade, respectivamente, no baço, coração, estômago, fígado e rim entre o grupo controle (A-E) e o grupo teste (F-J). (H/E, 20x).



Fonte: Elaboração própria

Potencial Aneugênico e Clastogênico - Teste do micronúcleo

A Tabela 13 apresenta a contagem de micronúcleos por meio dos valores médios dos potenciais clastogênico e aneugênico do HP (controle negativo) e do HBG, após a administração de uma dose única de 2.000 mg/kg, nenhum dos grupos induziu um aumento na frequência de micronúcleos quando comparado com o grupo controle positivo.

Tabela 13 - Análise da mutagenicidade de HP e HBG em células de sangue periférico de camundongos após administração única (2.000 mg/kg).

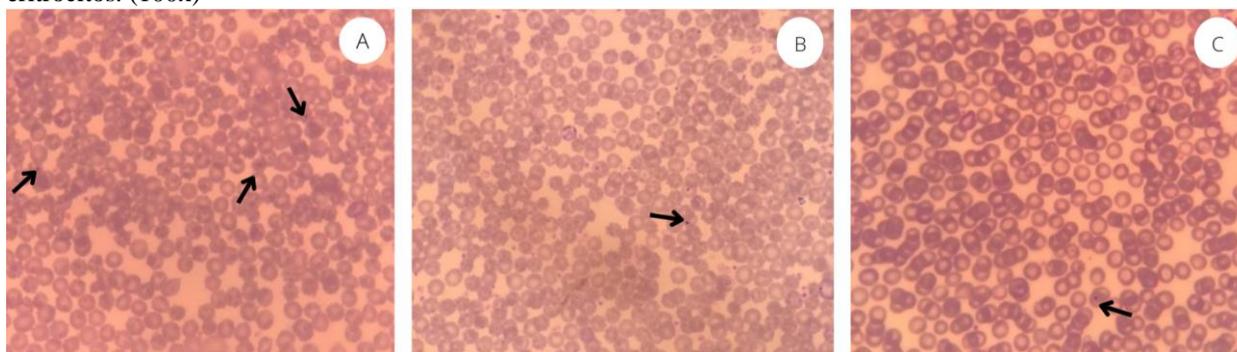
| Grupo | Contagem de micronúcleos em eritrócitos ¹ |
|--|--|
| Ciclofosfamida (50mg/kg) – Controle Positivo | 7,66 ± 1,86 ^a |
| HP (Controle negativo) | 3,33 ± 1,96 ^b |
| HBG | 2,5 ± 1,37 ^b |

¹ Micronúcleos/1.000 eritrócitos, valores expressos em Média ± Desvio-Padrão (n=6). Letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa.

Fonte: Elaboração própria

A Figura 12 representa a fotomicrografia dos eritrócitos de camundongos após a administração da dose única de substâncias.

Figura 12 - Fotomicrografia dos eritrócitos após administração em dose única: A – Ciclofosfamida (50 mg/kg); B – HBG (2.000 mg/kg); C - HP (controle negativo) – setas apontam micronúcleos em eritrócitos. (100x)



Fonte: Elaboração própria

6 DISCUSSÃO

O tratamento da candidose oral baseia-se em três fundamentos: diagnóstico precoce e preciso quanto ao tipo, correção dos fatores predisponentes ou doenças de base e uso dos antifúngicos mais adequados (QUINDÓS et al., 2019). Entretanto, o arsenal limitado de agentes antifúngicos é um dos pontos que dificulta a capacidade de combater infecções fúngicas (VILA et al., 2020), logo, a busca por novas alternativas para tal tratamento é de grande interesse (IVANOV et al., 2021).

Todavia, o processo de descoberta e desenvolvimento de medicamentos é demorado e consome muitos recursos (LIRA et al., 2022). Atualmente, a descoberta de novos fármacos depende especialmente da interação de uma molécula orgânica com um alvo (GHANNAY; KADRI; AOUADI, 2020).

Tanto a eficácia quanto a segurança dependem da farmacocinética do composto, uma vez que, geralmente, há uma relação entre a magnitude e a duração de um efeito e os perfis de concentração no plasma ou no sangue *versus* o tempo (AUNGST, 2017). Para tanto, os resultados obtidos por meio da análise computacional podem ser úteis para os pesquisadores avançarem no desenvolvimento de fármacos semissintéticos e sintéticos prospectivas para usos diversos (AWADELKAREEM et al., 2022).

Tal análise pode ser obtida com modelos *in silico*, por meio de ferramentas que podem desempenhar um papel fundamental para avaliar o risco à saúde de produtos químicos ambientais e farmacêuticos, especialmente quando a única característica conhecida é a estrutura de um produto químico (RUIZ et al., 2012). Tais modelos podem ser obtidos por meio de *softwares* diversos, observando, por exemplo, propriedades farmacológicas, farmacocinéticas e toxicidade teórica de compostos. Em estudo anterior, foram identificados como compostos majoritários do extrato etanólico de *B. gardneriana*, por meio da Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG-EM), o Ácido Piroglutâmico, o Eucaliptol e o Ácido Octanóico (SOUZA-MELO et al., 2021).

O Eucaliptol é vastamente investigado na literatura por meio de estudos *in silico*, *in vitro* e *in vivo*, apresentando, *in silico*, potencial atividade antiviral (MARINHO et al., 2022), sem grau de toxicidade de AMES e toxicidade oral aguda grau III (GOMES et al., 2020) e potencial inibidor de protease da COVID-19 (SHARMA; KAUR, 2020).

Um estudo *in vitro*, por meio de testes de microdiluição, demonstrou potencial atividade desse composto na formação inicial de biofilmes de *Streptococcus pyogenes* (VIJAYAKUMAR et al., 2020). Além disso, ensaios *in vivo* demonstraram atividade anti-inflamatória em pacientes asmáticos (JUERGENS et al., 2003) e, em modelos animais, alívio da dor e da inflamação em artrite induzida em camundongos (YIN et al., 2020).

Para o presente estudo foram investigados os compostos Ácido L-Piroglutâmico e o Ácido Octanoico, etil éster por meio dos *softwares* PASS *online*, *Moliinspiration* e *admetSAR*.

O *software* PASS (*Prediction of Activity Spectra for Substances*) é uma ferramenta que avalia o potencial biológico geral de uma molécula orgânica semelhante a um fármaco, fornecendo, com base na estrutura dos compostos orgânicos, previsões simultâneas de muitos tipos de atividade biológica (KANDEEPAN et al., 2021). Os resultados são demonstrados como “Pa” (categoria de compostos “ativos”) e “Pi” (categoria de compostos “inativos”) (UDHWANI et al., 2019). Ambos compostos estudados por meio do *software* PASS *online* demonstraram propriedades antibacteriana e antifúngica, que caracterizam importantes atividades biológicas de um composto.

As propriedades moleculares, incluindo biodisponibilidade e permeabilidade da membrana, têm sido associadas a muitos descritores moleculares fundamentais, como logP (coeficiente de partição), peso molecular (PM) ou número de aceptores e doadores de ligações de hidrogênio em uma molécula (PANIKAR; SHOBA; ARUN, 2021). Esses descritores podem ser observados por meio do *software* *Moliinspiration*. De acordo com Paramashivam et al (2015), moléculas de fármacos de baixo peso molecular (<500) são facilmente transportadas, difundidas e absorvidas em comparação com moléculas pesadas, esse quesito também foi observado no presente estudo onde os compostos Ácido L-Piroglutâmico e o Ácido Octanoico, etil éster apresentaram peso molecular de 129.12 e 172.27, respectivamente. Além disso, apresentaram logP de -2.40 e 3.70, sendo então (<5), que é o limite aceitável para que os fármacos possam penetrar através das biomembranas (PARAMASHIVAM et al., 2015). Outrossim, quanto a biodisponibilidade não houve nenhuma violação o que caracteriza uma boa biodisponibilidade.

Após o estabelecimento dos dados do ADMET na década de 1990, a maioria das empresas farmacêuticas passou a utilizar essa abordagem computacional para a triagem de medicamentos (AWADELKAREEM et al., 2022). Prever a penetração da barreira

hematoencefálica (BHE) significa prever se o alvo passa pela Barreira Sanguínea do Cérebro. Ao apresentar valor positivo, indica que os compostos estudados podem facilmente atravessar a BHE, mas valores abaixo de 1 ($C_{Brain}/C_{blood} < 1$), sugerem que são inativos no SNC (Sistema Nervoso Central) (GHANNAY; KADRI; AOUADI, 2020). O Ácido L-Piroglutâmico e o Ácido Octanoico, etil éster apresentaram, respectivamente, valores de 0.9612 e 0.9863. Tais resultados mostram que por serem valores abaixo de 1 sugerem que as moléculas investigadas são inativas no SNC.

De acordo com Schyman et al (2017), há benefício duplo em prever compostos permeáveis à BHE, identificar substâncias tóxicas que podem prejudicar o cérebro e projetar moléculas de fármacos que podem passar pela BHE e atingir seu alvo no SNC. Ainda no *software* admetSAR foram observados resultados referentes ao metabolismo, por meio da análise de substratos e inibição do complexo citocromo P450, para ambos compostos estudados não houve inibição para essa isoforma. De acordo com Awadelkareem et al (2022), a inibição do CYP3A4 pode levar diretamente à toxicidade do medicamento, interações medicamentosas e outros efeitos adversos.

A LD₅₀ (a dose de uma substância de teste que se espera matar 50% dos animais testados por via oral ou dérmica) ou LC₅₀ (para a via de inalação) valores de testes de toxicidade sistêmica aguda em roedores são usados para atribuir categorias de toxicidade a substâncias que, por sua vez, determinam os avisos de perigo exibidos nos rótulos dos produtos (STRICKLAND et al., 2018). Na triagem de fármacos, a determinação de LD50 é geralmente um passo inicial das características tóxicas de uma substância (JESUS et al., 2021). Os achados referentes à toxicidade, por meio da LD50, demonstraram valores de possíveis doses LD50 teórica para toxicidade aguda em ratos de 2.081 mol/kg para o Ácido L-Piroglutâmico e de 1.4690 mol/kg para o Ácido Octanoico, etil éster. É imperioso destacar que testes toxicológicos precisam ser realizados para avaliar quais desses produtos químicos são seguros e quais podem causar toxicidade (GADALETA et al., 2019).

Por várias décadas, as plantas medicinais têm desempenhado um papel fundamental nos estudos de pesquisa farmacológica e no desenvolvimento de medicamentos (MOUSSAOUI et al., 2020). As melhorias dos medicamentos atuais são valiosas, pois podem oferecer benefícios em termos de potência, segurança, tolerabilidade ou conveniência, mas geralmente não envolvem a manipulação de alvos biológicos diferentes daqueles diretamente afetados pelos medicamentos existentes (MOHS; GREIG, 2017).

A primeira prioridade na pesquisa fitoterápica é a avaliação da segurança dos produtos fitoterápicos (SHAFAEI et al., 2015). Além disso, é imprescindível afirmar que a caracterização físico-química e tecnológica é uma etapa fundamental no projeto de sistemas de liberação de fármacos (CRISTIANO et al., 2020).

A preparação de formulações modernas e inovadoras permite a entrega de substâncias ativas em um determinado local, no momento certo e com efeitos colaterais mínimos (BIALIK et al., 2021). A capacidade de um determinado copolímero em bloco, como o PF127, formar uma de várias estruturas termodinamicamente estáveis (reversíveis) dependendo da concentração, temperatura e co-solventes, é uma de suas propriedades mais exclusivas e poderosas (BODRATTI; ALEXANDRIDIS, 2018). Materiais termorresponsivos para uso médico têm sido de grande interesse devido à temperatura fisiológica relativamente universal de 37 °C e ao desenvolvimento de vários mecanismos para manipular e controlar a temperatura *in vivo* (KOETTING et al., 2015).

Os hidrogeis termosensíveis gelificam à temperatura corporal e são mais convenientes de administrar; sua matriz formada pode proteger as células incorporadas e os fármacos frágeis e a sua liberação de moléculas bioterapêuticas pode ser controlada, melhorando a eficácia e reduzindo os efeitos colaterais (HUANG et al., 2019), além disso, a transição sol-gel do hidrogel *in situ* acomoda sua forma à geometria da área tratada (VALENTINO et al., 2022) e a gelificação facilita a fixação da solução no local alvo, permitindo que ela funcione como base (ZHOU et al., 2017).

O Pluronic[®] F127 é um copolímero atóxico, biocompatível e termoativo, capaz de gelificar à temperatura corporal, podendo ser utilizado para a preparação de hidrogéis e organogéis destinados à administração local de medicamentos (WRÓBLEWSKA; SZYMAŃSKA; WINNICKA, 2021). Além disso, a transição líquido-gel dependente da temperatura é uma propriedade interessante para o desenvolvimento de formulações mucoadesivas (GIULIANO et al., 2018).

O PF127 tem sido amplamente utilizado na área biomédica devido à sua baixa toxicidade, excelente compatibilidade com outros produtos químicos e alta capacidade solubilizante para diferentes fármacos. Em concentrações de 20% ou mais em solução aquosa exibe a propriedade única de gelificação térmica reversível (DERAKHSHANDEH; FASHI; SEIFOLESLAMI, 2010). Permite a formação de géis de água incolores, transparentes e facilmente laváveis, não irritantes para a pele e mucosas (BIALIK et al., 2021).

Dessa forma, foi desenvolvido um hidrogel à base de PF127 a 20% incorporado ao extrato etanólico de *B. gardneriana* a fim de se avaliar propriedades físico-químicas, potencial anti-*Candida* e toxicidade, *in vivo*, em modelo animais. Para avaliar as propriedades físico-químicas foram investigadas resistência à centrifugação, estabilidade preliminar, espalhabilidade e viscosidade.

Primeiramente, foi realizado o teste de resistência a centrifugação. Esse teste produz estresse na amostra simulando um aumento na força de gravidade, aumentando a mobilidade das partículas e antecipando possíveis instabilidades, podendo ser observadas na forma de precipitação, separação de fases, formação de *caking*, coalescência entre outras (BRASIL, 2004). Após a centrifugação não foram observadas alterações quanto a precipitação, separação de fases ou pH das amostras.

O estudo da estabilidade contribui para orientar o desenvolvimento da formulação e do material de acondicionamento; fornecer subsídios para aperfeiçoamento das formulações; estimar o prazo de validade e fornecer informações para sua confirmação; auxiliar no monitoramento da estabilidade organoléptica, físicoquímica e microbiológica, produzindo informações sobre a confiabilidade e segurança dos produtos (ISAAC et al., 2008). A estabilidade física de uma formulação é fundamental para o controle de qualidade, aceitação pelo consumidor e eficácia da mesma (CORRÊA et al., 2005). Durante os seis ciclos de congelamento e descongelamento, não foram observadas alterações quanto a cor, odor ou separação de fases. Com relação ao pH durante esse teste, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Além disso, o pH das amostras foi analisado antes e após a resistência à centrifugação apresentando valores de 6,7 para o HP e 5,75 para o HBG, ambos considerados ácidos.

A saliva é incolor, inodoro e tem uma densidade relativa de 1,004-1,009 e um pH de 6,6-7,1 (SANTOSH et al., 2020). O pH crítico é o pH no qual uma solução é apenas saturada em relação a um determinado mineral, como o esmalte. Se o pH da solução estiver acima do pH crítico a solução é supersaturada em relação ao esmalte, e mais mineral tenderá a precipitar. Por outro lado, se o pH da solução for menor, a solução é insaturada e o mineral tenderá dissolver até que a solução fique saturada (DAWES, 2003). O pH crítico depende tanto da solubilidade do sólido de interesse quanto das concentrações dos constituintes minerais relevantes da solução (LUSSI et al., 2011).

O pH crítico de 5,5 usado para a dinâmica da cárie dental foi por muitos anos também utilizado para a erosão dental. Recentemente questiona-se este valor e infere-se que não há pH crítico fixo para a erosão do esmalte dental, uma vez que este dependerá da presença de minerais na solução, especialmente o cálcio (RITA; FARIAS; SILVEIRA, 2018). Deve-se notar que o pH por si só não é um bom indicador do potencial erosivo de qualquer substância; o grau de saturação da solução em relação ao esmalte e consistência do agente (duração do contato com a superfície do dente) desempenham um papel importante no processo de erosão (BELARDINELLI et al., 2014). Sendo assim, é imperioso destacar que, na maioria dos casos, o tratamento da candidose orais é realizado em curtos períodos, não havendo a extensa duração do contato entre o fármaco e a superfície dentária.

O teste de espalhabilidade se baseia na resistência ao movimento forçado. Os resultados correspondem à relação entre a área de espalhamento com a força aplicada sobre o produto e o esforço limite, relação que corresponde ao fator de espalhabilidade (CORDEIRO et al., 2013). Além disso, a espalhabilidade está ligada a adesão do paciente ao tratamento (EL-KASED et al., 2017), visto que é uma propriedade muito importante das formulações tópicas semissólidas, pois indica a facilidade de aplicação das formulações na pele ou mucosa (CONEAC et al., 2015).

Os resultados apresentados permitiram verificar que a incorporação do extrato ao hidrogel de PF127 não inferiu diferenças estatisticamente significativa entre os grupos, tendo ambas as amostras comportamentos semelhantes. Coneac et al (2015), ao avaliarem a espalhabilidade de hidrogeis, consideraram que diferentes formulações apresentaram boa espalhabilidade, comprovada por valores relativamente altos de áreas de espalhamento (em torno de 20 cm²), tomando por base esse estudo, é possível inferir que tanto o HP quanto o HBG apresentaram valores semelhantes de área de espalhamento quando convertidos de mm² para cm². Outrossim, Silva et al (2019) afirmaram que uma boa espalhabilidade ocorre quando essa aumenta à medida em que o peso é adicionado, apresentando capacidade de espalhar-se e abranger o local de ação, o mesmo pode ser observado no presente estudo, quanto maior a quantidade de placas maior a espalhabilidade dos hidrogeis.

A viscosidade pode ser entendida como uma resistência do fluido a um escoamento de cisalhamento, ou seja, quando um fluido é submetido a uma tensão, se ele flui de maneira rápida pode-se dizer que ele é pouco viscoso e se o fluido possui certa resistência a escoar e por isso sua fluidez é baixa, pode-se dizer que ele é um

fluido altamente viscoso (SILVA; SILVA JR; PINTO JR., 2019). A avaliação desse parâmetro ajuda a determinar se um produto apresenta a consistência ou fluidez apropriada e pode indicar se a estabilidade é adequada, ou seja, fornece indicação do comportamento do produto ao longo do tempo (BRASIL, 2004).

No presente estudo, a viscosidade das amostras foi aferida por meio de um viscosímetro do tipo Brookfield que mede a viscosidade pela força necessária para girar o *spindle* no líquido que está sendo testado (BRASIL, 2019). É possível observar que em ambas as temperaturas investigadas (5 °C e 30 °C) à medida que se aumentava a velocidade de rotação do *spindle* havia a diminuição da viscosidade. Tal diminuição é sugerida devido à dissociação de emaranhados físicos entre os componentes hidrofóbicos de PPO (polioxipropileno) (KHAN et al., 2019).

Quando ocorre essa diminuição sugere-se que o hidrogel se comporta como fluido do tipo não newtoniano (pseudoplástico) (ULLAH et al., 2021). Esses tipos de fluidos têm uma viscosidade aparente que diminui com o aumento da taxa de cisalhamento (IONESCU et al., 2020). Esse comportamento corrobora com outros estudos que investigaram a viscosidade de hidrogéis à base do PF127 (NAIR et al., 2021; ULLAH et al., 2021).

No tocante ao potencial anti-*Candida albicans*, houve redução de 3 log₁₀ do HBG quando comparado ao controle de crescimento (inóculo sem fármaco). Segundo Boyce e Pitter (2002), a eficácia antimicrobiana de 1 log₁₀ (redução de 90%), 2 log₁₀ (99%), 3 log₁₀ (99,9%) ou 4 log₁₀ (99,99%), de acordo com as diretrizes de controle de infecção. Desse modo, é possível destacar que o HBG apresentou eficácia antimicrobiana contra *Candida albicans* de 99,9%, a mesma eficácia foi encontrada para o extrato.

Esses resultados são interessantes e permitem reiterar os dados da pesquisa anterior realizada com esse extrato, que demonstrou atividade antifúngica contra *Candida albicans* com CIM de 125 µg/mL, além de espécies não-*albicans* revelando o potencial anti-*Candida* do extrato (SOUZA-MELO et al., 2021). É possível observar também que não houve redução logarítmica ou diferença estatisticamente significativa entre o HP e o controle de crescimento revelando que a atividade antimicrobiana apresentada pelo HBG é proveniente da ação antimicrobiana do extrato incorporado ao polímero.

A nistatina (controle positivo), antifúngico pertencente à classe dos Polienos, apresentou eficácia de 99,99%, reduzindo 4 log₁₀. Todavia, apesar dessa classe ter um

amplo espectro de atividades antifúngicas, sua má absorção pelo intestino limita seu uso no tratamento da candidose oral (MAGHU; DESAI; SHARMA, 2016), outrossim, o uso da nistatina é limitado, dentre outros aspectos, pelo sabor amargo, efeitos colaterais gastrointestinais e dosagem quatro vezes ao dia, o que contribui para a redução da adesão ao medicamento e menor eficácia (MUKHERJEE et al., 2017).

A detecção de atividade citotóxica para um fitoterápico constitui um parâmetro prioritário para o desenvolvimento futuro de novos fármacos (ARAÚJO et al., 2018). A avaliação das propriedades tóxicas de uma substância é decisiva quando se considera a proteção da saúde pública, pois a exposição a produtos químicos pode ser arriscada e resultar em efeitos adversos ao ser humano (MEKONNEN et al., 2019).

O teste de toxicidade sistêmica aguda identifica o potencial de um produto químico causar efeitos adversos distantes do ponto de entrada após a exposição a uma dose única (STRICKLAND et al., 2018). A observação diária durante 14 dias confirmou que o HBG não causou morbidade, mortalidade, comportamento incomum ou sinais clínicos adversos nos animais.

O peso dos animais é um possível indicador de danos causados pela substância avaliada, sendo de vital importância em um estudo de toxicidade (RIVAS et al., 2013). A *Organization of Economic Co-operation and Development* (OECD) considera aceitável uma variação de até 20% do peso corporal. Além das variações comportamentais, a toxicidade de um composto pode ser avaliada por meio de mudanças no ganho de peso animal, redução no consumo de água e comida, e alterações na excreção de urina e fezes (OECD, 2001).

No presente estudo, não houve diferença estatisticamente significativa entre peso inicial ($p = 0,109$), peso final ($p = 0,180$) e ganho de peso ($p = 0,07$) dos animais quando comparados os grupos. A variação de peso corporal foi de 8,22% para os animais do grupo HP e de 5,75% para os animais do grupo HBG, sendo essas variações pertencentes ao que se considera aceitável pela OECD (2001).

Também foram observados ao longo do teste de toxicidade oral aguda os consumos de água e ração. Houve diferença estatisticamente significativa apenas para o consumo de ração do grupo HBG quando comparado ao grupo controle ($p = 0,006$). Não havendo diferença significativa no consumo de água pelos animais. Todavia, apesar da diferença estatisticamente significativa no consumo de ração, não houve perda de peso corporal em nenhum dos animais.

O peso relativo do órgão é considerado um dos principais indicadores de toxicidade do órgão (SUNDARAM et al., 2021). Os dados do presente estudo permitiram inferir que só houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com relação ao índice do estômago ($p = 0,020$), os demais órgãos investigados não apresentaram diferença significativa quando comparados os grupos com dose única de HP e HBG. Levando em consideração que não houve alterações macroscópicas ou microscópicas nesse órgão, tal diferença significativa pode ter ocorrido em virtude do tamanho da amostra.

Tendo em vista que durante os 14 dias do experimento, não foram observadas mortes em nenhum animal tratado com dose única de 2.000 mg/kg, torna-se possível estimativa de DL50 de 5.000mg/kg, categoria 5 do GSH (Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos), segundo as normas do Guia n. 423 da OECD. Tais achados reforçam os dados encontrados no estudo anterior em que houve baixa atividade hemolítica do extrato etanólico de *B. gardneriana* para todos os tipos sanguíneos testados (SOUZA-MELO et al., 2021).

Ao exame microscópico, após processamento histopatológico dos órgãos, não foram observados sinais de toxicidade, como: hiperemia, presença de infiltrado inflamatório, binucleação, sinusóides dilatados e megalocitose (no fígado) ou mineralização da luz tubular (nos rins).

As informações de genotoxicidade têm sido amplamente utilizadas para a avaliação de risco de segurança de produtos químicos, juntamente com toxicidade geral, carcinogenicidade, toxicidade reprodutiva e outros parâmetros. A característica diferente da genotoxicidade de muitas outras toxicidades é a visibilidade dos fenômenos toxicológicos (HAYASHI, 2022). O ensaio de micronúcleo detecta tanto clastogenicidade (quebra cromossômica) e aneugenicidade (atraso cromossômico devido à disfunção do fuso mitótico) e é projetado principalmente para avaliar a capacidade dos agentes de teste para induzir estruturas e/ou dano cromossômico numérico (KIM et al., 2019).

Micronúcleos são fragmentos de DNA que não foram incorporados ao núcleo durante a divisão celular apresentando relação com agentes mutagênicos ou clastogênicos (UCHÔA; MAGALHÃES, 2020). Pode ocorrer como resultado de processos naturais, como metabolismo ou envelhecimento, ou pode ser induzido por diversos fatores ambientais, hábitos e diversas doenças (SOMMER; BURACZEWSKA; KRUSZEWSKI, 2020).

Dentre os inúmeros ensaios de genotoxicidade, o teste do micronúcleo é especialmente recomendado para avaliar os efeitos genotóxicos de agentes químicos e físicos, bem como de misturas de substâncias (KWASNIEWSKA; BARA, 2022). No presente estudo, observou-se que os dados do ensaio do micronúcleo não apresentaram diferença estatisticamente significativa na contagem de micronúcleos em eritrócitos entre os grupos de HBG e HP.

É imperioso destacar, que estudos na literatura sobre o extrato de *Byrsonima gardneriana* e formulações incorporadas a ele são escassos ou até mesmo inexistentes, dessa forma, pode-se destacar o caráter inédito do presente estudo. Todavia, no que diz respeito a formulação, mais investigações e ensaios biológicos são necessários para aplicação clínica do hidrogel.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do exposto, ressalta-se que cada vez mais a busca por alternativas aos antifúngicos convencionais tem sido de grande relevância na área da saúde. Outrossim, para que novos fármacos sejam desenvolvidos mais investigações são necessárias. Sendo assim, por meio do presente estudo, conclui-se que:

- Ensaios *in silico* demonstraram que compostos majoritários do extrato de *B. gardneriana* apresentaram:
 - Propriedades antimicrobianas, possivelmente exibem capacidade de sofrer absorção através da barreira hematoencefálica e do intestino humano e, teoricamente, são fracos inibidores do gene codificador de canais de potássio (HERG), não tóxicos pelo teste AMES e categoria III de toxicidade oral aguda.
- O Hidrogel à base de PF127 incorporado ao extrato etanólico de *B. gardneriana*:
 - Apresentou propriedades físico-químicas importantes, como: resistência à centrifugação, estabilidade, espalhabilidade e viscosidade.
 - Demonstrou ser um potencial agente antifúngico sobre o crescimento de *Candida albicans*;
 - Não apresentou toxicidade oral aguda em modelos animais, além de não apresentar diferença estatisticamente significativa na contagem de micronúcleos em eritrócitos de camundongos quando comparado ao hidrogel sem a incorporação do extrato;
 - Revelando-se como promissor, a partir da verificação de mais atividades e métodos.

REFERÊNCIAS

- AHMED, E. M. Hydrogel: preparation, characterization, and applications: A review. **Journal of Advanced Research**, p. 105–121, 2015.
- ALBUQUERQUE, U. P. et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p. 325–354, 2007.
- ANGELI, F. D. et al. Anti-Candidal Activity of the Parasitic Plant *Orobancha crenata* Forssk. **Antibiotics**, v. 10, p. 1–27, 2021.
- ANIBAL, P. C. et al. Conventional and alternative antifungal therapies to oral candidiasis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 824–831, 2010.
- ARAÚJO, J. S. C. et al. Antibacterial activity against cariogenic bacteria and cytotoxic and genotoxic potential of *Anacardium occidentale* L. and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan extracts. **Archives of Oral Biology**, v. 85, p. 113–119, 2018.
- ARENDRUP, M. C. Epidemiology of invasive candidiasis. **Current Opinion in Critical Care**, v. 16, n. 5, p. 445–452, 2010.
- AUNGST, B. J. Optimizing Oral Bioavailability in Drug Discovery : An Overview of Design and Testing Strategies and Formulation Options. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 106, n. 4, p. 921–929, 2017.
- AWADELKAREEM, A. M. et al. Phytochemical and In Silico ADME/Tox Analysis of *Eruca sativa* Extract with Antioxidant, Antibacterial and Anticancer Potential against Caco-2 and HCT-116 Colorectal Carcinoma Cell Lines. **Molecular Pharmaceutics**, v. 27, 2022.
- BATRAKOVA, E. V.; KABANOV, A. V. Pluronic Block Copolymers: Evolution of Drug Delivery Concept from Inert Nanocarriers to Biological Response Modifiers. **Control**, v. 130, n. 2, p. 98–106, 2008.
- BELARDINELLI, P. A. et al. Effect of two mouthwashes on salivary pH. **Acta odontologica latinoamericana : AOL**, v. 27, p. 66–71, 2014.
- BIALIK, M. et al. Achievements in Thermosensitive Gelling Systems for Rectal Administration. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, 2021.
- BODRATTI, A. M.; ALEXANDRIDIS, P. Formulation of Poloxamers for Drug Delivery. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 9, 2018.
- BOYCE, J. M.; PITTET, D. Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings Recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Centers for Disease Control and Prevention TM. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 51, 2002.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**. 6ª edição, Brasília, 2019.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**. 1ª edição, Brasília, 2004.

- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para a Condução de Toxicologia e Segurança Farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. 2ª versão, Brasília, 2013.
- BROWN, G. D. et al. Hidden killers: Human fungal infections. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 165, 2012.
- CASTILHO, A. R. F.; PARDI, V.; MURATA, R. M. Produtos Naturais em Odontologia. **Revista Saúde**, p. 11–19, 2007.
- CESARE, G. B. DE et al. Antimicrobial Peptides: a New Frontier in Antifungal Therapy. **mBio**, v. 11, n. 6, p. 1–21, 2020.
- CHANDRA, W. et al. The potential management of oral candidiasis using anti-biofilm therapies. **Medical Hypotheses**, v. 106, p. 15–18, 2017.
- CHAUDHARY, B.; VERMA, S. Preparation and Evaluation of Novel In Situ Gels Containing Acyclovir for the Treatment of Oral Herpes Simplex Virus Infections. **The Scientific World Journal**, 2014.
- CHEESMAN, M. J. et al. Developing New Antimicrobial Therapies: Are Synergistic Combinations of Plant Extracts/Compounds with Conventional Antibiotics the Solution? **Pharmacognosy Reviews**, v. 11, n. 22, p. 57–72, 2020.
- CHEN, Y. et al. An Overview on Thermosensitive Oral Gel Based on An Overview on Thermosensitive Oral Gel Based on Poloxamer. **Materials**, v. 600, 2021.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **M27-A3 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard - Third Edition**. Wayne, Pennsylvania, USA: [s.n.]. v. 22
- CONEAC, G. et al. Development and Evaluation of New Microemulsion-Based Hydrogel Formulations for Topical Delivery of Fluconazole. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 16, n. 4, 2015.
- CORDEIRO, M. S. F. et al. Desenvolvimento tecnológico e avaliação de estabilidade de gel dermatológico a partir do óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 94, n. 2, p. 148–153, 2013.
- CORRÊA, N. M. et al. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p. 73–78, 2005.
- CRISTIANO, M. C. et al. The Rheolaser MasterTM and Kinexus rotational rheometer[®] to evaluate the influence of topical drug delivery systems on rheological features of topical poloxamer gel. **Molecules**, v. 25, n. 8, 2020.
- DA, X. et al. Antifungal activity and mechanism of action of Ou-gon (*Scutellaria* root extract) components against pathogenic fungi. **Scientific Reports**, n. May 2018, p. 1–12, 2019.
- DARTEVELLE, P. et al. D-Cateslytin : a new antifungal agent for the treatment of oral *Candida albicans* associated infections. **Scientific Reports**, n. May, p. 1–10, 2018.
- DAVID, J. P. et al. Radical scavenging, antioxidant and cytotoxic activity of Brazilian Caatinga plants. **Fitoterapia**, v. 78, n. 3, p. 215–218, 2007.
- DAWES, C. What Is the Critical pH and Why Does a Tooth Dissolve in Acid ? **Journal**

of the **Canadian Dental Association**, v. 69, n. 11, p. 722–724, 2003.

DERAKHSHANDEH, K.; FASHI, M.; SEIFOLESLAMI, S. Thermosensitive Pluronic® hydrogel: prolonged injectable formulation for drug abuse. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 4, p. 255–262, 2010.

DESHKAR, S. S.; JADHAV, M. S.; SHIROLKAR, S. V. Development of Carbamazepine Nanostructured Lipid Carrier Loaded Thermosensitive Gel for Intranasal Delivery. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 11, n. 1, p. 150–162, 2021.

DONG, L. et al. Reversible and long-term immobilization in a hydrogel-microbead matrix for high-resolution imaging of *Caenorhabditis elegans* and other small organisms. **PLOS ONE**, p. 1–20, 2018.

EL-KASED, R. F. et al. Honey-based hydrogel : In vitro and comparative *in vivo* evaluation for burn wound healing. **Scientific Reports**, n. March, p. 1–11, 2017.

FARAH, C. S.; LYNCH, N.; MCCULLOUGH, M. J. Oral fungal infections: an update for the general practitioner. **Australian dental journal**, v. 55 Suppl 1, p. 48–54, 2010.

FATHI, M. et al. Hydrogels for ocular drug delivery and tissue engineering. **BioImpacts**, v. 5, n. 4, p. 159–164, 2015.

FEITOSA, M. H. A. et al. Inserção do Conteúdo Fitoterapia em Cursos da Área de Saúde. **Revista Brasileira de Educação Médica**, v. 40, n. 2, p. 197–203, 2016.

FERNANDES, K. E.; CARTER, D. A. Cellular plasticity of pathogenic fungi during infection. **PLoS Pathogens**, p. 1–7, 2020.

FERREIRA, A. DE O. **Guia Prático de Farmácia Magistral**. 4. ed. São Paulo: Pharmabooks Editora, 2010.

FIRACATIVE, C. Invasive fungal disease in humans: are we aware of the real impact ? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 115, p. 1–9, 2020.

FREIRES, I. A.; ROSALEN, P. L. How Natural Product Research has Contributed to Oral Care Product Development? A Critical View. **Pharmaceutical Research**, v. 33, n. 6, p. 1311–1317, 2016.

GADALETA, D. et al. RESEARCH ARTICLE SAR and QSAR modeling of a large collection of - LD 50 rat acute oral toxicity data. **Journal of Cheminformatics**, p. 1–16, 2019.

GARCIA-CUESTA, C.; SARRION-PÉREZ, M. G.; BAGÁN, J. V. Current treatment of oral candidiasis: A literature review. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, v. 6, n. 5, p. e576–e582, 2014.

GHANNAY, S.; KADRI, A.; AOUADI, K. Synthesis, in vitro antimicrobial assessment, and computational investigation of pharmacokinetic and bioactivity properties of novel trifluoromethylated compounds using in silico ADME and toxicity prediction tools. **Monatshefte für Chemie**, v. 151, n. 2, 2020.

GIACOMAZZI, J. et al. The burden of serious human fungal infections in Brazil. **Mycoses**, v. 59, n. 3, p. 145–150, 2016.

GIANNINI, P. J.; SHETTY, K. V. Diagnosis and management of oral candidiasis. **Otolaryngologic Clinics of North America**, v. 44, n. 1, p. 231–240, 2011.

- GIOFFREDI, E. et al. Pluronic F127 Hydrogel Characterization and Biofabrication in Cellularized Constructs for Tissue Engineering Applications. **Procedia CIRP**, v. 49, p. 125–132, 2016.
- GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 3, p. 225–234, 2010.
- GIULIANO, E. et al. Mucosal Applications of Poloxamer 407-Based Hydrogels : An Overview. **Pharmaceutics**, v. 10, p. 1–26, 2018.
- GIULIANO, E. et al. Drug-Loaded Biocompatible Nanocarriers Embedded in Poloxamer 407 Hydrogels as Therapeutic Formulations. **Medicines**, 2019.
- GIULIANO, E. et al. Rutin-loaded poloxamer 407-based hydrogels for *in situ* administration: Stability profiles and rheological properties. **Nanomaterials**, v. 10, n. 6, p. 3–5, 2020.
- GOMES, L. L. et al. Análise *in silico* da toxicidade do monoterpene eucaliptol. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 5, p. 1–11, 2020.
- GOW, N. A. R.; NETEA, M. G. Medical mycology and fungal immunology: New research perspectives addressing a major world health challenge. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 371, n. 1709, 2016.
- GUILHON-SIMPLICIO, F.; DE MENESES PEREIRA, M. Aspectos químicos e farmacológicos de *Byrsonima* (Malpighiaceae). **Quimica Nova**, v. 34, n. 6, p. 1032–1041, 2011.
- GUIMARÃES, M. M.; SILVA, M. S. Valor nutricional e características químicas e físicas de frutos de murici-passa (*Byrsonima verbascifolia*). **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p. 817–821, 2008.
- HAYASHI, M. et al. *In vivo* erythrocyte micronucleus assay III . Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes , with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test. **Mutation Research**, v. 627, p. 10–30, 2007.
- HAYASHI, M. Opinion : regulatory genotoxicity: past, present and future. **Genes and Environment**, p. 1–6, 2022.
- HELLSTEIN, J. W.; MAREK, C. L. Candidiasis: Red and White Manifestations in the Oral Cavity. **Head and Neck Pathology**, v. 13, n. 1, p. 25–32, 2019.
- HUANG, H. et al. Thermo-sensitive hydrogels for delivering biotherapeutic molecules : A review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 27, n. 7, p. 990–999, 2019.
- IONESCU, C. M. et al. Mathematical modelling with experimental validation of viscoelastic properties in non-Newtonian fluids Subject Areas : **Phil.Trans.R.Soc.**, 2020.
- ISAAC, V. L. B. et al. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 29, n. 1, p. 81–96, 2008.
- IVANOV, M. et al. Camphor and Eucalyptol — Anticandidal Spectrum , Antivirulence Effect , Efflux Pumps Interference and Cytotoxicity. **International Journal of**

Molecular Sciences, v. 22, 2021.

JESUS, R. DE et al. Determination of medium lethal dose (LD50) and acute toxicity of formulation Cytoreg ® , an ionic mixture of strong and weak acids . **Latin American Journal of Development**, v. 3, p. 1121–1126, 2021.

JUERGENS, U. R. J. et al. Anti-inflammatory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) in bronchial asthma: a double-blind placebo-controlled trial. **Respiratory Medicine**, v. 97, p. 250–256, 2003.

KANDEEPAN, C. et al. Journal of Drug Delivery and Therapeutics In-silico ADMET Pharmacoinformatics of Geraniol (3 , 7-dimethylocta-trans- 2 , 6-dien-1-ol) - acyclic monoterpene alcohol drug from Leaf Essential Oil of *Cymbopogon martinii* from Sirumalai Hills (Eastern Ghats) India. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 11, p. 109–118, 2021.

KHAN, S. et al. Evaluation of microneedles-assisted *in situ* depot forming poloxamer gels for sustained transdermal drug delivery. **Drug Delivery and Translational Research**, p. 764–782, 2019.

KIM, J. Y. Human fungal pathogens: Why should we learn? **Journal of Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 145–148, 2016.

KIM, S. et al. In vivo micronucleus test of 4-butylaniline and N -butylaniline to classify a chemical' s mutagenicity according to the globally harmonized system of classification and labelling of chemicals (GHS). **Journal of Applied Biological Chemistry**, v. 62, p. 355–359, 2019.

KNORST, M. T. **Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo extrato concentrado de *Achyrocline satureioides* (LAM.) Dc. compositae (Marcela)**. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, 1991.

KOETTING, M. C. et al. Stimulus-responsive hydrogels: Theory, modern advances, and applications. **Materials Science and Engineering R: Reports**, v. 93, p. 1–49, 2015.

KONG, E. F. et al. Clinical implications of oral candidiasis: Host tissue damage and disseminated bacterial disease. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 2, p. 604–613, 2015.

KONG, E. F. et al. Development and *in vivo* evaluation of a Novel Histatin-5 bioadhesive hydrogel formulation against Oral Candidiasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 2, p. 881–889, 2016.

KWASNIEWSKA, J.; BARA, A. W. Plant Cytogenetics in the Micronuclei Investigation — The Past , Current Status , and Perspectives. **International Journal of Molecular Sciences**, 2022.

LALLA, R. V.; PATTON, L. L.; DONGARI-BAGTZOGLOU, A. Oral candidiasis: pathogenesis, clinical presentation, diagnosis and treatment strategies. **Journal of the California Dental Association**, v. 41, n. 4, p. 263–268, 2013.

LI, J.; MOONEY, D. J. Designing hydrogels for controlled drug delivery. **Nature Reviews Materials**, v. 1, n. 12, p. 1–18, 2016.

- LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DIMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n. 1-3, p. 3-26, 2001.
- LIRA, A. B. et al. Evaluation of Toxicity and Oxidative Stress of 2-Acetylpyridine- N (4) -ortho-chlorophenyl Thiosemicarbazone. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2022.
- LIU, Y. et al. Thermosensitive In Situ Gel Based on Solid Dispersion for Rectal Delivery of Ibuprofen. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, 2017.
- LUSSI, A. et al. Dental Erosion – An Overview with Emphasis on Chemical and Histopathological Aspects. **Caries**, v. 45, n. suppl 1, p. 2–12, 2011.
- MAGALHÃES, M. M. **Avaliação da toxicidade aguda in vivo após exposição oral a nanopartículas de óxido de cobre, de acordo com as Diretrizes do Guia 420 da OECD**. Dissertação de Mestrado em Vigilância Sanitária, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2018.
- MAGHU, S.; DESAI, V. D.; SHARMA, R. Journal of Traditional and Complementary Medicine Comparison of ef fi cacy of alternative medicine with allopathy in treatment of oral fungal infection. **Journal of Traditional Chinese Medical Sciences**, v. 6, n. 1, p. 62–65, 2016.
- MARINHO, T. O. et al. Atividade antiviral do monoterpene 1 , 8-cineol: estudo *in silico*. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 4, p. 1–5, 2022.
- MARTÍNEZ, C. C.; GÓMEZ, M. D.; OH, M. S. Use of traditional herbal medicine as an alternative in dental treatment in Mexican dentistry: a review. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 1992–1998, 2017.
- MAUBON, D. et al. Resistance of *Candida* spp. to antifungal drugs in the ICU: Where are we now? **Intensive Care Medicine**, v. 40, n. 9, p. 1241–1255, 2014.
- MEKONNEN, A. et al. Evaluation of Skin Irritation and Acute and Subacute Oral Toxicity of *Lavandula angustifolia* Essential Oils in Rabbit and Mice. **Journal of Toxicology**, 2019.
- MELO, A. M. A. et al. Potencial antifúngico de *Byrsonima gardneriana* (A. Juss.) e *Erythroxylum revolutum* (Mart.) sobre *Candida albicans*. **Brazilian Oral Research**, p. 175, 2016.
- MENDES, C. C. et al. Triterpenos esterificados com ácidos graxos e ácidos triterpênicos isolados de *Byrsonima micropiylla*. **Química Nova**, v. 22, n. 2, p. 185–188, 1999.
- MILLSOP, J. W.; FAZEL, N. Oral candidiasis. **Clinics in Dermatology**, v. 34, n. 4, p. 487–494, 2016.
- MOHS, R. C.; GREIG, N. H. Drug discovery and development : Role of basic biological research. **Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions**, v. 3, n. 4, p. 651–657, 2017.
- MOUSSAOUI, A. E. L. et al. Phytochemical Identification, Acute, and Sub-Acute Oral Toxicity Studies of the Foliar Extract of *Withania frutescens*. **Molecules**, v. 25, p. 1–10, 2020.

- MUKHERJEE, P. K. et al. Topical gentian violet compared to nystatin oral suspension for the treatment of oropharyngeal candidiasis in HIV-1 Infected participants. **AIDS**, v. 31, n. 1, p. 81–88, 2017.
- MUNDULA, T. et al. Effect of Probiotics on Oral Candidiasis : A Systematic. **Nutrients**, p. 1–19, 2019.
- NAGAI, N. et al. *In situ* Gelling Systems Using Pluronic F127 Enhance Corneal Permeability of Indomethacin Nanocrystals. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, p. 1–13, 2020.
- NAIR, A. B. et al. Experimental design , formulation and *in vivo* evaluation of a novel topical *in situ* gel system to treat ocular infections. **PLoS ONE**, p. 1–18, 2021.
- NARAYANASWAMY, R.; TORCHILIN, V. P. Hydrogels and Their Applications in Targeted Drug Delivery. **Molecules**, v. 24, 2019.
- NASRA, M. M. A. et al. Formulation, *in-vitro* characterization and clinical evaluation of curcumin *in-situ* gel for treatment of periodontitis. **Drug Delivery**, v. 7544, n. 1, p. 133–142, 2017.
- OECD. **Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method** **Guideline for Testing of Chemicals**, 2001. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-423-acute-oral-toxicity-acute-toxic-class-method_9789264071001-en>
- OLIVEIRA, F. Q. et al. Espécies vegetais indicadas na odontologia. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 3, p. 466–476, 2007.
- ORLANDI, L. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of the stem bark of *Byrsonima intermedia* A. Juss. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 3, p. 1469–1476, 2011.
- PANIKAR, S.; SHOBA, G.; ARUN, M. Essential oils as an effective alternative for the treatment of COVID-19: Molecular interaction analysis of protease (Mpro) with pharmacokinetics and toxicological properties. **Journal of Infection and Public Health**, v. 14, p. 601–610, 2021.
- PAPON, N. et al. Emerging and Emerged Pathogenic *Candida* species: Beyond the *Candida albicans* Paradigm. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 9, 2013.
- PARAMASHIVAM, S. K. et al. *In silico* pharmacokinetic and molecular docking studies of small molecules derived from *Indigofera aspalathoides* Vahl targeting receptor tyrosine kinases. **Bionformation**, v. 11, n. 2, 2015.
- PATEL, M. Oral Cavity and *Candida albicans*: Colonisation to the Development of Infection. **Pathogens**, v. 11, 2022.
- PATIAS, I. S. et al. Estabilidade e atividade antifúngica de nanoemulsão contendo óleo de gerânio incorporada em hidrogel. **Disciplinarum Scientia**, v. 17, n. 2, p. 269–283, 2016.
- PEIXOTO, J. V. et al. Candidíase: uma revisão de literatura. **Brasilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 8, n. 2, p. 75–82, 2014.
- PERLIN, D. S.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management.

The Lancet Infectious Diseases, v. 17, n. 12, p. e383–e392, 2017.

PRISTOV, K. E.; GHANNOUM, M. A. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 7, p. 792–798, 2019.

QUINDÓS, G. et al. Therapeutic tools for oral candidiasis: Current and new antifungal drugs. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 24, n. 2, p. e172–e180, 2019.

RITA, M. R.; FARIAS, M. M. A. G.; SILVEIRA, E. G. DA. Potencial erosivo de pastilhas e balas duras “zero açúcar” dissolvidas em água e saliva artificial. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, v. 30, n. 3, p. 246–255, 2018.

RIVAS, C. A. B. et al. Toxicidad aguda oral de *Azadirachta indica* (árbol del Nim) Acute oral toxicity of *Azadirachta indica* (Neem Tree). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 18, n. 3, p. 502–507, 2013.

ROCHA, E. A. L. DE S. S. et al. Irradiação a Laser de baixa intensidade sobre cepas de *Candida in vitro*. **Revista Cubana de Estomatología**, v. 51, n. 3, p. 358–365, 2014.

ROLIM, T. L. et al. Constituintes químicos e atividade antioxidante de *Byrsonima gardneriana* (Malpighiaceae). **Quimica Nova**, v. 36, n. 4, p. 524–527, 2013.

RUIZ, P. et al. Prediction of Acute Mammalian Toxicity Using QSAR Methods: A Case Study of Sulfur Mustard and Its Breakdown Products. **Molecules**, v. 17, p. 8982–9001, 2012.

RUSSO, E.; VILLA, C. Poloxamer hydrogels for biomedical applications. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 12, 2019.

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; LASS-FLÖRL, C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: Mechanisms and clinical impact. **Mycoses**, v. 58, n. S2, p. 2–13, 2015.

SANTOS, K. L. M. et al. Photodynamic Potential of Hexadecafluoro Zinc phthalocyanine in Nanostructured Lipid Carriers: Physicochemical Characterization, Drug Delivery and Antimicrobial Effect Against *Candida albicans*. **Lasers in Medical Science**. 2022.

SANTOSH, T. S. et al. A Review of Salivary Diagnostics and Its Potential Implication in Detection of Covid-. **Cureus**, v. 12, n. 4, 2020.

SCHYMAN, P. et al. vNN Web Server for ADMET Predictions. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, p. 1–14, 2017.

SERRA, E. et al. Methylcellulose hydrogel with *Melissa officinalis* essential oil as a potential treatment for oral candidiasis. **Microorganisms**, v. 8, n. 2, 2020.

SEYEDJAVADI, S. S. et al. Characterization , Biological Activity , and Mechanism of Action of a Plant- Based Novel Antifungal Peptide , Cc- AFP1 , Isolated From *Carum carvi*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 1–12, 2021.

SHAFAEI, A. et al. Genotoxicity , acute and subchronic toxicity studies of nano liposomes of *Orthosiphon stamineus* ethanolic extract in Sprague Dawley rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, p. 1–14, 2015.

- SHARMA, A. D.; KAUR, I. Eucalyptol (1,8 cineole) from eucalyptus essential oil a potential inhibitor of COVID 19 corona virus infection by Molecular docking studies. **Preprints**, 2020.
- SHARPE, L. A. et al. Therapeutic applications of hydrogels in oral drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, 2014.
- SHESHALA, R. et al. Investigation on solution-to-gel characteristic of thermosensitive and mucoadhesive biopolymers for the development of moxifloxacin-loaded sustained release periodontal *in situ* gels. **Drug Delivery and Translational Research**, 2018.
- SILVA, C. M. DA; SILVA JR, T. L. E; PINTO JR., I. M. Caracterização reológica de fluidos não newtonianos e sua aplicabilidade na indústria. **Cadernos de Graduação Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 5, n. 2, p. 285–300, 2019.
- SILVA, F. V. F. et al. Desenvolvimento e controle de qualidade de um gel-creme antiacneico a base do óleo da *Copaifera officinalis* L. (copaíba). **Electronic Journal Collection Health**, v. 30, p. 1–10, 2019.
- SILVA, L. N. . et al. Anti-infective effects of Brazilian Caatinga plants against pathogenic bacterial biofilm formation. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 3, p. 464–468, 2015.
- SLAUGHTER, B. V. et al. Hydrogels in Regenerative Medicine. **Adv Mater.**, p. 3307–3329, 2009.
- SOMMER, S.; BURACZEWSKA, I.; KRUSZEWSKI, M. Micronucleus Assay : The State of Art , and Future Directions. **International Journal of Molecular Sciences**, p. 7–9, 2020.
- SOUZA-MELO, W. O. et al. Phytochemistry , antifungal and antioxidant activity , and cytotoxicity of *Byrsonima gardneriana* (A . Juss) extract. **Archives of Oral Biology**, v. 123, 2021.
- SOUZA, M. A. et al. Contribution of Litter and Leaf Decomposition of *Byrsonima gardneriana*. **Floresta e Ambiente**, v. 26, n. 1, p. 1–10, 2019.
- SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: Traditional and alternative antifungal agents. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.
- SRINIVAS, N. et al. In Vitro Cytotoxic Evaluation and Detoxification of Monocrotaline (Mct) Alkaloid : An *In Silico* Approach. **International Invention Journal of Biochemistry and Bioinformatics**, v. 2, n. 2, p. 20–29, 2014.
- STRICKLAND, J. et al. Status of Acute Systemic Toxicity Testing Requirements and Data Uses by U.S. Regulatory Agencies. **Regul Toxicol Pharmacol.**, p. 183–196, 2018.
- SULTAN, A. S. ; et al. Evaluation of the Antifungal and Wound-Healing Properties of a Novel Peptide-Based Bioadhesive Hydrogel Formulation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 10, p. 1–11, 2019.
- SUNDARAM, V. et al. Acute and subacute toxicity evaluation of hydroalcoholic extract from the stem bark of Bois Bande (*Parinari campestris* Aubl . 1772) in rats. **BMC Pharmacology and Toxicology**, p. 1–10, 2021.
- TELLES, D. R.; KARKI, N.; MARSHALL, M. W. Oral Fungal Infections: Diagnosis

- and Management. **Dental Clinics of North America**, v. 61, n. 2, p. 319–349, 2017.
- TOMCZYKOWA, M. et al. Novel Gel Formulations as Topical Carriers for the Essential Oil of *Bidens tripartita* for the Treatment of Candidiasis. **Molecules**, v. 23, 2018.
- TRENTIN, D. S. et al. Tannins Possessing Bacteriostatic Effect Impair *Pseudomonas aeruginosa* Adhesion and Biofilm Formation. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.
- UCHÔA, I. S.; MAGALHÃES, A. A. V. Brazilian Journal of health Review
Micronucleus test an important Cellular Biomarker. **Brazilian Journal of Health Review**, p. 3851–3857, 2020.
- UDHWANI, T. et al. Design of PD-L1 inhibitors for lung cancer. **Bioinformation**, v. 15, n. 2, p. 139–150, 2019.
- ULLAH, K. H. et al. Poloxamer 407 Based Gel Formulations for Transungual Delivery of Hydrophobic Drugs : Selection and Optimization of Potential Additives. **Polymers**, v. 13, 2021.
- VALENTINO, A. et al. Thermo-Responsive Gel Containing Hydroxytyrosol-Chitosan Nanoparticles (Hyt@tgel) Counteracts the Increase of Osteoarthritis Biomarkers in Human Chondrocytes. **Antioxidants**, v. 11, p. 1–17, 2022.
- VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A. T. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. **International Journal of Microbiology**, 2012.
- VIJAYAKUMAR, K. et al. Eucalyptol inhibits biofilm formation of *Streptococcus pyogenes* and its mediated virulence factors. **Journal of Medical Microbiology**, v. 69, p. 1308–1318, 2020.
- VILA, T. et al. Oral candidiasis: A disease of opportunity. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 1, p. 1–28, 2020.
- WANG, S. et al. Application of nanotechnology in improving bioavailability and bioactivity of diet-derived phytochemicals. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 25, n. 4, p. 363–376, 2014.
- WILLIAMS, D. W. et al. *Candida* biofilms and oral candidosis: Treatment and prevention. **Periodontology 2000**, v. 55, n. 1, p. 250–265, 2011.
- WONG, S. S. W. et al. *In vitro* and *in vivo* activity of a novel antifungal small molecule against *Candida* infections. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.
- WRÓBLEWSKA, M.; SZYMAŃSKA, E.; WINNICKA, K. The Influence of Tea Tree Oil on Antifungal Activity and Pharmaceutical Characteristics of Pluronic® F-127 Gel Formulations with Ketoconazole. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, 2021.
- YANG, J. et al. Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Combined Pluronic F127 Hydrogel Promote Chronic Diabetic Wound Healing and Complete Skin Regeneration. **International Journal of Nanomedicine**, p. 5911–5926, 2020.
- YIN, C. et al. Eucalyptol alleviates inflammation and pain responses in a mouse model of gout arthritis. **The British Pharmacological Society**, v. 177, p. 2042–2057, 2020.

ZHOU, P.R.; HUA, H.; LIU, X.S. Quantity of *Candida* colonies in saliva: a diagnostic evaluation for oral Candidiasis. **The Chinese Journal of Dental Research**, v. 20, n. 1, p. 27-32, 2017.

ZHU, J. Bioactive Modification of Poly(ethylene glycol) Hydrogels for Tissue Engineering. **Biomaterials**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2010.

ZIENTAL, D. et al. Photosensitizers Mediated Photodynamic Inactivation against Fungi. **Nanomaterials**, v. 11, 2021.

ZORTÉA, M. E. B. et al. Avaliação da viscosidade aparente de pastas de amidos nos viscosímetros Brookfield RVDV-II PRO e Rápido Visco-analisador RVA-4. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 05, n. 01, p. 326–335, 2011.

ZUBAIR, M. et al. GC/MS profiling, in vitro antioxidant, antimicrobial and haemolytic activities of *Smilax macrophylla* leaves. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S1460–S1468, 2013.

ANEXOS

Anexo A – Certificado de Aprovação do Projeto de Pesquisa pelo CEUA – Comitê de Ética no Uso Animal da Universidade Estadual da Paraíba.



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “DESENVOLVIMENTO DE UM HIDROGEL À BASE DO EXTRATO DE *Byrsonima gardneriana* (A. JUSS) PARA USO FUTURO NO TRATAMENTO DA CANDIDOSE ORAL” registrada com o nº 021/2021, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Jozinete Vieira Pereira, que envolve o uso de camundongos *Mus musculus swiss*, para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 08 de outubro de 2008, com o decreto 6.899 de 05 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADA pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual da Paraíba.

| | |
|-------------------------|--|
| Finalidade | () Ensino (X) Pesquisa Científica |
| Vigência da autorização | 11/2021 a 06/2022 |
| Espécie/linhagem/raça | Camundongos <i>Mus musculus/ swiss</i> |
| Nº de animais | 24 (vinte e quatro) |
| Idade | 05 a 07 semanas |
| Sexo | fêmeas e machos |
| Origem | Centro de Bioterismo da UEPB |

Informação ao pesquisador:

Lembramos que a pesquisadora responsável deverá encaminhar à CEUA-UEPB o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, previsto para conclusão em 06/2022.

Campina Grande, 10 de dezembro de 2021.

Rosilda Pereira dos Santos
Coordenadora da CEUA/UEPB

AGRADECIMENTOS

A Deus, por Sua Infinita Misericórdia ter me sustentado para chegar até aqui, “Que poderei retribuir ao Senhor Deus, por tudo aquilo que Ele fez em meu favor?” (Salmo 115).

À Nossa Senhora, minha Amiga e Mãe do Céu, por interceder junto ao Seu Filho por cada passo por mim percorrido.

Aos meus pais, Walder e Luciene, e ao meu irmão Willian, por serem minha base, meu refúgio e minha felicidade. Sem vocês não seria possível conseguir.

A minha prima-irmã, Mayara Ingrid, pela mão que me cuidou quando mais precisei, dando-me meios para completar esta caminhada.

Aos meus amados avós, Antônio, Risalva e Maria das Dores, pelas constantes orações e apoio.

Ao meu amado avô, Geraldo Lourenço (*in memoriam*), que, mesmo não estando mais aqui, sempre será uma das minhas inspirações de vida.

A toda a minha família, pelas vibrações por minha carreira profissional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPgO-UEPB), bem como ao seu corpo docente, pelos ensinamentos e oportunidades.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Fundo de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ) pelo incentivo financeiro por meio do recebimento de Bolsa no primeiro semestre do curso de Doutorado.

A minha orientadora, Professora Doutora Jozinete Vieira, pela orientação, muito além dos assuntos acadêmicos ao longo desses anos, ética e cuidado para comigo.

Ao meu coorientador, Professor Doutor João Augusto Oshiro, pela dedicação com a qual me auxiliou na execução deste trabalho.

Ao Professor Doutor Josean Fechine Tavares pela disponibilização do extrato de *Byrsonima gardneriana* (A. Juss) para a continuação da execução deste trabalho.

Aos Professores Doutores Abrahão Alves e Pollianna Muniz por todo auxílio a mim concedido.

Aos Professores Doutores Ricardo Castro e Edja Costa pelas valiosas contribuições a este trabalho durante a qualificação.

À Professora Daliana Queiroga, por tanto me ensinar e me inspirar.

À Bianca Franzoni e toda a equipe do Centro de Bioterismo da UEPB, pela indispensável ajuda na condução dos testes laboratoriais.

À Katharina Lima, pelo auxílio nas minhas análises.

Ao grupo de pesquisa, pela parceria firmada nessa jornada.

Aos alunos do Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos (LDCPF) da UEPB, em especial a Lívia, Gisele, Sara, Demis, Monalisa e Naara, pelo auxílio nos testes laboratoriais.

Ao meu amigo, Ramon Targino, pelo apoio não apenas neste trabalho, mas durante todo o processo.

Aos meus amigos do trabalho, em especial a Monalisa, Jossaria, Clarissa, Ramon, Carla e Suely, pela parceria e leveza com que fazem os meus dias no trabalho serem ainda melhores e pelo apoio ao longo desta caminhada.

Aos meus amigos de uma vida toda, que estiveram ou não diretamente ligados a este trabalho, por torcerem por mim e se alegrarem com minhas conquistas.

Aos meus colegas de turma, pelo percurso trilhado juntos.

Aos funcionários do Departamento de Odontologia, pela presteza sempre que precisei.

A todos aqueles, que direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização deste trabalho.