

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Efeito *in vitro* do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume  
sobre *Candida* spp. envolvidas com infecções orais

Marianne de Lucena Rangel

SAPIENTIA AEDIFICAT

2016

**MARIANNE DE LUCENA RANGEL**

Efeito *in vitro* do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume sobre *Candida* spp. envolvidas com infecções orais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração em Ciências Odontológicas.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro

João Pessoa-PB

2016

R196e Rangel, Marianne de Lucena.  
Efeito *in vitro* do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume sobre *Candida spp.* Envolvidas com infecções orais / Marianne de Lucena Rangel. - João Pessoa, 2016.

35 f.: il. -

Orientador: Ricardo Dias de Castro.  
Dissertação (Mestrado) - UFPB/ CCS

1. Odontologia. 2. Candidose bucal. 3. Candidíase.  
4. Antifúngicos. 5. Biofilmes. 6. *Cinnamomum zeylanicum*.  
I. Título.

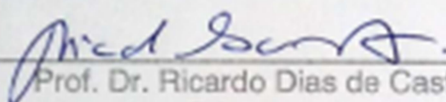
UFPB/BC

CDU: 613.314(043)

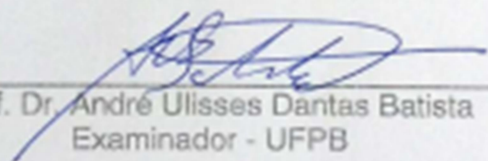
MARIANNE DE LUCENA RANGEL

EFEITO *IN VITRO* DO ÓLEO ESSENCIAL DE *CINNAMOMUM*  
*ZEYLANICUM* BLUME SOBRE *CANDIDA* SPP ENVOLVIDAS  
COM INFECÇÕES ORAIS

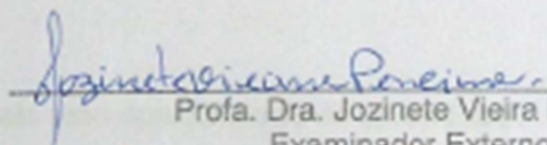
Banca Examinadora



Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro  
Orientador



Prof. Dr. André Ulisses Dantas Batista  
Examinador - UFPB



Profa. Dra. Jozinete Vieira Pereira  
Examinador Externo

## DEDICATÓRIA

**A Deus,**

Por mais uma oportunidade de aprendizado nessa eterna caminhada que é a vida.

**À minha mãe,**

Meu maior amor e exemplo.

## **AGRADECIMENTOS**

A sabedoria divina e aos amigos que silenciosamente trabalham para que desde a minha chegada a esse mundo eu pudesse vivenciar as experiências de amor e as dificuldades necessárias para o meu aprimoramento espiritual.

Ao professor Ricardo Dias de Castro, pelas oportunidades que me foram dadas desde a graduação, por me acolher no mestrado e fazer desta uma experiência de aprendizado incrível sendo uma verdadeira referência por praticar a docência com responsabilidade, humanidade, verdade, amor e respeito. Saiba que registrastes em mim o teu exemplo de profissional e humano.

Aos professores das bancas de qualificação e defesa: Prof. Dr. André Ulisse Dantas Batista, Profa. Dra. Jozinete Vieira Pereira e Profa. Dra. Sabrina Garcia de Aquino, pela disponibilidade em compartilhar seus conhecimentos em prol do aprimoramento deste trabalho.

Aos professores que compõe o NUMETROP, na pessoa da professora Ana Maria Gondim Valença, que me permitiram utilizar o espaço para a realização deste trabalho.

Aos professores Sabrina Garcia de Aquino e Lúcio Roberto Cançado Castellano que, mesmo com pouco tempo de convivência, despertaram em mim enorme admiração pelo dom de unir o trabalho responsável à alegria e horizontalidade na relação com os alunos. Desejar a docência e conviver com vocês é um grande estímulo.

Aos colegas de Mestrado pelo auxílio mútuo que tanto facilitaram essa jornada. Em especial ao amigo Jefferson, por sua disposição em ajudar, pelo desprendimento e capacidade de dividir os seus conhecimentos e pelo ser humano tranquilo e generoso que é.

A amiga Naiana Braga com quem dividi minhas primeiras experiências no laboratório e com quem muito aprendi.

Aos amigos do grupo de pesquisa, que por ele já passaram e os que hoje fazem parte, por dividirem ricos momentos de aprendizado, pela partilha do aprendizado e estímulo para a vida acadêmica.

Aos funcionários e técnicos da UFPB, que permitem o funcionamento da instituição. Em especial aos do NUMETROP pela convivência, conversas e cafezinhos que quebravam a rotina do laboratório.

A minha mãe, Lúcia, por escolher abdicar de si mesma para receber a mim e aos meus irmãos, dedicando a sua vida, sorrindo nossos pequenos aprendizados e vitórias, chorando as nossas dificuldades e erros, como se todos fossemos apenas um, e acima de tudo, nos amando e respeitando as nossas individualidades.

A Renata pela fiel companhia e partilha nas alegrias e novos desafios, sempre aliviando cada passo com a alegria do seu sorriso.

Ao meu pai, Marcelo, pelo exemplo de excelência, competência e dedicação ao trabalho.

A minha família por ser o meu grande exemplo de união e amor em meio às diferenças. Em especial aos meus irmãos, Marcelo e Mayara, por serem meus grandes companheiros nessa passagem.

A pequena Luna pela felicidade que enche o meu coração ao lhe encontrar sempre que chego em casa.

Minha gratidão a todos que dentro do ambiente da universidade ou fora dele, deixaram em mim um pouco de si e somaram na construção desse ser em constante formação.

## **EPÍGRAFE**

**`` A consciência é meu guia**

**A paz é meu abrigo**

**A experiência é minha escola**

**O obstáculo é a minha lição``**

Vozes do espírito - Chico Xavier

## RESUMO

**Introdução:** A candidose bucal é uma infecção oportunista causada por leveduras do gênero *Candida*. As evidências do aumento da resistência microbiana suscitam por novas estratégias para prevenção e tratamento desta doença. Assim, o estudo de plantas consiste em uma alternativa terapêutica relevante, sendo o *Cinnamomum zeylanicum* bem explorada pela variedade de atividades biológicas comprovadas, destacando-se seu efeito antifúngico.

**Objetivo:** Avaliar a atividade antifúngica e o mecanismo de ação do óleo essencial (OE) extraído de folhas de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Canela) sobre cepas de *Candida* spp..

**Materiais e Métodos:** O perfil fitoquímico do OE de folhas de *C. zeylanicum* Blume foi traçado por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM). Foram determinadas a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) do OE sobre cepas de referência de *Candida* spp. (ATCC e CBS) e cepas clínicas coletadas da cavidade bucal, pela técnica de microdiluição e da semeadura do subcultivo, respectivamente. Para verificar se o OE de *C. zeylanicum* Blume tem ação direta na estrutura da parede celular ou altera a permeabilidade iônica da membrana celular, foram realizados os ensaios do sorbitol e ergosterol, respectivamente. Posteriormente, o método de contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) foi utilizado para analisar a cinética do crescimento e multiplicação de *C. albicans* em contato com OE na CIM, CIMx2 e CIMx4 durante 0h, 1h, 2h, 6h, 8h, 12h e 24h. Por fim, avaliou-se o efeito do OE sobre a formação e redução de biofilmes de *Candida* spp.. Os controles positivos utilizados para os ensaios foram nistatina, caspofungina e anfotericina B e controles negativos do meio de cultura, da substância teste e do veículo também foram verificados. Os dados foram tratados estatisticamente (Kruskal-Wallis com *post hoc* de Dunn,  $\alpha = 0,05$ ).

**Resultados:** O OE das folhas de *C. zeylanicum* Blume possui 26 componentes, sendo o eugenol o componente majoritário. Demonstrou ter atividade fungicida sobre as espécies testadas, com valores de CIM e CFM variando entre 62,5 a 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Quanto ao modo de ação, a atividade antifúngica do OE de *C. zeylanicum* Blume parece estar relacionada com as vias de biossíntese da parede celular fúngica. O ensaio de cinética demonstrou que a atividade antifúngica do OE na CIM ocorre com 24h e na CIMx2 e CIMx4 com 8h de contato. O OE

provocou inibição da formação de biofilmes mono e multiespécie de *Candida* spp., com reduções variando de 34,94% a 49,42% sob a concentração de 500 µg/mL. Nesta mesma concentração, o biofilme maduro foi sensível ao OE com variações no percentual de redução entre 50,18% - 63,62% (24h de ação do OE) e 30,2% - 59,26% (48h de ação do OE). **Conclusões:** O OE das folhas de *C. zeylanicum* Blume possui o eugenol como componente majoritário, apresenta atividade antifúngica sobre células planctônicas e biofilmes mono e multiespécie de *Candida* spp., atuando nas vias de biossíntese da parede celular.

**Palavras-chave:** Candidíase, Antifúngicos, Biofilmes, *Cinnamomum zeylanicum*.

## ABSTRACT

**Introduction:** Oral candidiasis is an opportunistic infection caused by yeasts of *Candida* genus. Evidence of increased microbial resistance stimulates the search of new strategies to prevent and treat this disease. Thus, the study of plants consists in a relevant therapeutic alternative, being *Cinnamomum zeylanicum* well investigated due the variety of biological activities proven, highlighting its antifungal effect. **Objective:** Evaluate the antifungal activity and mode of action of an essential oil (EO) extracted from *Cinnamomum zeylanicum* Blume leaves on *Candida* spp.. **Material and Methods:** The EO from *C. zeylanicum* Blume leaves had the phytochemical profile determined by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry. Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC) were determined on reference strains of *Candida* spp. (ATCC and CBS) and clinical strains collected from oral cavity, by microdilution technique and subculture, respectively. The sorbitol and ergosterol assays were performed in order to determine whether the EO interacts directly on the cell wall structure or modify the cell membrane ionic permeability. The growth inhibition kinetics of *C. albicans* in contact with EO in the MIC, MIC 2 and MIC 4 for 0h, 1h, 2h, 6h, 8h, 12h and 24h, were evaluated. Finally, was evaluated the effect of EO on the formation and reduction of *Candida* spp. biofilms. Nystatin, caspofungin or amphotericin B were used as positive controls and the culture medium, substance and vehicle were the negative controls. Data were statistically treated (Kruskal-Wallis, Dunn's *post hoc*,  $\alpha = 0,05$ ). **Results:** The EO from *C. zeylanicum* Blume leaves has 26 components, with eugenol being the major component. It demonstrates to have fungicidal activity, with MIC and MFC values ranged from 62.5 to 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . With regard to the mode of action, the antifungal activity of *C. zeylanicum* Blume EO seems to be related to fungal cell wall biosynthesis pathways. The kinetics assay demonstrated that the antifungal activity of EO in the MIC occurs in 24h and in the CIMx2 and CIMx4 in 8h of contact. The EO 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  concentration inhibited the formation of mono- and multi-species biofilms of *Candida* spp., with reductions ranging from 34.94% to 49.42%. The same concentration caused reductions of the mature biofilm ranging from 50.18%-63.62% (24h of EO action) and 30.2%-59.26% (48h EO action). **Conclusions:** The EO from *C. zeylanicum* Blume leaves has eugenol as the

major component, demonstrated antifungal activity on planktonic cells and biofilms of *Candida* spp. and act on cell wall biosynthesis pathways.

**Key-words:** Candidiasis, Antifungal Agents, Biofilms, *Cinnamomum zeylanicum*.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASD – Agar Sabouraud Dextrose

ATCC – American Type Culture Collection

CBS – Central Bureu Voor Schimmelcultures

CFM - Concentração Fungicida Mínima

CG – Cromatografia Gasosa

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CSD – Caldo Sabouraud Dextrose

g – grama (s)

µL - Microlitros (s)

µg - Micrograma (s)

M - Molar

mL – mililitro (s)

mm - milímetro (s)

OE - Óleo Essencial

PBS - Tampão Fosfato Salino

TCT – 2 3 5-trifenil cloreto de tetrazólio

UFC – Unidade Formadora de Colônia

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. CAPÍTULO 1.....	7
1. INTRODUÇÃO.....	8
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
2.1. Produto teste.....	9
2.2. Local de realização da pesquisa.....	9
2.3. Análise fitoquímica (GCMS –QP2010 Ultra).....	10
2.4. Microrganismos .....	10
2.5. Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	11
2.6. Concentração Fungicida Mínima (CFM) .....	11
2.7. Mecanismo de Ação do Óleo essencial.....	12
2.7.1. Teste do Sorbitol .....	12
2.7.2. Teste do Ergosterol.....	12
2.8. Avaliação da Cinética de inibição do OE de <i>C. zeylanicum</i> sobre crescimento fúngico.....	13
2.9. Avaliação da atividade antimicrobiana do OE de <i>C. zeylanicum</i> Blume sobre o biofilme monoespécie e multiespécie de <i>Candida</i> spp.....	14
2.9.1. Avaliação da atividade antimicrobiana do OE de <i>C. zeylanicum</i> Blume sobre a formação do biofilme de <i>Candida</i> spp.....	14
2.9.2. Quantificação da biomassa de biofilme.....	14
2.9.3. Avaliação da atividade antimicrobiana do OE de <i>C. zeylanicum</i> Blume na redução do biofilme maduro de <i>C. albicans</i> .....	15
2.9.4. Quantificação da biomassa de biofilme.....	16
2.10. Análise estatística.....	16
3. RESULTADOS.....	16
3.1. Perfil cromatográfico e identificação dos compostos do OE de <i>C.</i> <i>zeylanicum</i> Blume.....	16
3.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM).....	17
3.3. Mecanismo de ação do OE de <i>C. zeylanicum</i> Blume.....	18
3.4. Avaliação da Cinética de inibição do OE. De <i>C. zeylanicum</i> Blume sobre crescimento fúngico.....	19
3.5. Efeito do OE de <i>C. zeylanicum</i> Blume sobre biofilme mono e multiespécie de <i>Candida</i> spp.....	20
4. DISCUSSÃO.....	22

5.	CONCLUSÃO.....	27
6.	REFERÊNCIAS .....	28
3.	CONCLUSÃO.....	32
4.	REFERÊNCIAS.....	33

## 1. INTRODUÇÃO

Infecções fúngicas representam um problema de saúde global provocando infecções invasivas em cerca de 1,5 milhões de pessoas por ano, algumas delas com índices de mortalidade próximos a 90%. Em sua maioria, essas infecções ocorrem em pacientes imunocomprometidos e são provocadas por microrganismos do gênero *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* e *Pneumocystis* (1, 2).

*Candida* spp. são microrganismos comensais e versáteis, capazes de sobreviver em nichos anatômicos diversos do organismo humano, com diferentes condições de ambiente e pressão, sendo colonizador de até 70% da população sem sinais clínicos de infecção. A espécie colonizadora humana mais predominante é *Candida albicans*, seguida de outras espécies como *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei* (3-7). A manutenção do estado comensal e não agressor de *Candida* é possível graças ao equilíbrio proporcionado pela microbiota anfibiótica das áreas de colonização, a integridade das barreiras físicas do organismo e a atividade funcional do sistema imune. Entretanto, alterações sistêmicas ou locais que interfiram nesses fatores podem desencadear um desequilíbrio no hospedeiro e predispor o desenvolvimento da doença chamada candidose, podendo variar desde um envolvimento superficial e localizado a uma doença fatal quando disseminada no organismo de em indivíduos imunocomprometidos (8).

As infecções superficiais provocadas por *Candida* são mais frequentes que as infecções sistêmicas, acometem superfícies epiteliais e mucosas, como na candidose bucal, vulvovaginal e cutânea. Infecções sistêmicas, apesar de menos frequentes, possuem uma incidência mundial superior a 400.000 casos por ano, sendo o quarto principal causador de infecções sanguíneas e com índices de mortalidade variando entre 10% a 75% (1, 9). A alta prevalência e morbidade da doença estão relacionadas aos atributos de virulência de *Candida* a exemplo do seu dimorfismo, que a torna capaz de alterar sua morfologia, de levedura para hifa, em resposta a alterações ambientais. As formas filamentosas (hifas e pseudohifas) são vistas como patogênicas, uma vez que são mais resistentes à fagocitose e possuem capacidade de penetrar nos tecidos (10). Além do

dimorfismo, outros atributos, tais como a expressão de fatores de adesão, adaptação ao stress, flexibilidade metabólica, a secreção de enzimas hidrolíticas e a capacidade de formar biofilme, estão implicados no processo de infecção (11-13).

Fatores locais como má higiene e traumas que rompem a barreira epitelial ou mucosa, facilitam a invasão microbiana e predisõem à infecção, como na candidose bucal provocada pelo uso de próteses dentárias mal adaptadas (6, 14). Devido ao caráter oportunista de *Candida*, alterações que conduzem à imunocompetência do organismo constituem fatores sistêmicos que favorecem a sua disseminação e o estabelecimento da infecção, como defeitos ou redução do número de neutrófilos, disfunções metabólicas, idade avançada, tratamento quimioterápico, doenças autoimunes, o uso de antibióticos de amplo espectro e transplantes (15). O desenvolvimento de candidose na cavidade bucal, como em outras partes do corpo, está relacionado com fatores sistêmicos que reduzem a atividade do sistema imunológico, além de fatores locais como xerostomia, higiene inadequada e traumas (16).

Pacientes acometidos pela doença podem ser assintomáticos ou sintomáticos, havendo diferenças nos sinais e sintomas de acordo com a área infectada. Nos quadros de candidose vulvovaginal pode-se observar prurido vulvar, ardor, dor e irritação, resultando em dispareunia e disúria. A candidose cutânea é caracterizada pela formação de placas eritematosas e brilhantes, podendo ser erosivas, ressecadas, escamosas e com exsudato purulento. Já nos casos da candidose bucal, os pacientes podem relatar dor, sensação de ardor, dor de garganta, dificuldade para deglutir e halitose. Os diagnósticos são feitos com base no exame físico e história clínica do paciente, podendo ser associado à cultura microbiológica para verificar a presença do microrganismo de *Candida* (9). Clinicamente, existem basicamente quatro tipos de candidose bucal: a pseudomembranosa, hiperplásica, eritematosa e a queilite angular, podendo haver manifestações isoladas ou combinadas entre os diferentes tipos (16).

Para o tratamento de infecções fúngicas provocadas por *Candida* existem basicamente quatro classes de medicamentos: poliênicos, azóis, equinocandinas e os anti-metabólitos. Entre os poliênicos destacam-se a anfotericina B e nistatina, moléculas que possuem estrutura anfifílica e por isso são capazes de se

ligar ao ergosterol da membrana celular do fungo formando complexos que resultam em poros na membrana, alterando o equilíbrio iônico da célula. Na classe dos azóis, o fluconazol é o mais utilizado e sua ação está relacionada à inibição da biossíntese do ergosterol, resultando em inibição do crescimento e da replicação fúngica. A caspofungina é a principal representante das equinocandinas, mais nova classe de antifúngicos, e possui mecanismo de ação relacionado com a ruptura da parede celular do fungo pela inibição da síntese de  $\beta$ -glucano, provocando instabilidade osmótica e morte celular. Os anti-metabólitos são os menos utilizados para infecções fúngicas provocadas por *Candida*, podem ser prescritos em associação com outras drogas como a anfotericina B e possuem efeito fungistático pela inibição da síntese de DNA e RNA (1, 2, 17).

Apesar das opções terapêuticas existentes, o aumento da resistência microbiana frente a antifúngicos de diferentes classes é crescente (1, 3, 18-20). Um dos mecanismos fortemente envolvidos com essa resistência é a habilidade de determinados microrganismos formarem biofilmes. Este é definido como uma comunidade microbiana envolvida em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares que desenvolve atividades integradas complexas, com ativação e inativação de genes que modificam o fenótipo das células em relação à forma planctônica das mesmas. Conseqüentemente, eleva-se a resistência aos fármacos e ao sistema imunológico do hospedeiro. A *Candida* possui a capacidade de formar biofilme sobre superfícies bióticas e abióticas. Essa habilidade constitui um fator de virulência importante para esses microrganismos, se tornando um interessante objeto de estudo no desenvolvimento de agentes antifúngicos para a candidose (21-24).

Somada à problemática da resistência microbiana, outras limitações na terapia antifúngica têm sido evidenciadas, como a toxicidade dos medicamentos, espectro de ação, segurança e propriedades farmacocinéticas. Além disso, os fungos, como os humanos, são seres vivos eucarióticos e por isso muitos potenciais alvos terapêuticos também estão presentes nos humanos, aumentando o risco de toxicidade e tornando o desenvolvimento de antifúngicos mais desafiador do que a produção de antibióticos (25).

Neste contexto, o estudo de plantas com propriedades terapêuticas, abrangendo aquelas com atividade antimicrobiana, tem crescido por constituir um recurso terapêutico alternativo, além da perspectiva de isolar substâncias que apresentem eficácia significativa para aplicações biológicas (26-28). Espécies vegetais brasileiras são usualmente utilizadas como antifúngicos e é notório que o Brasil, devido à sua diversidade vegetal, é um país conhecido mundialmente pela variedade de produtos com ação medicinal (29-31).

Uma das espécies vegetais avaliadas ao longo do tempo como detentora de propriedades biológicas importantes é a *Cinnamomum*, conhecida popularmente como canela. É uma planta pertencente à família Lauraceae encontrada nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, sendo formada por cerca de 250 espécies. Dentre estas, *Cinnamomum zeylanicum*, *Cinnamomum loureirii*, *Cinnamomum burmanni* e *Cinnamomum cassia* são as principais. Diversas partes da planta como casca, folhas, flores, frutos e raízes apresentam valor medicinal ou aplicação culinária. Os óleos voláteis obtidos de partes diferentes da mesma planta variam significativamente na sua composição química, o que conduz a diferentes efeitos farmacológicos. Como principais constituintes de *Cinnamomum zeylanicum*, destacam-se: o cinemaldeído (casca), eugenol (folha) e cânfora (raiz), (E)-acetato de cinamilo (fruto) e cariofileno (flores) (32-35).

Quanto às atividades biológicas de *Cinnamomum*, uma grande variedade de benefícios medicinais são descritos, incluindo aplicações como analgésico, antisséptico, anticâncer, antiespasmódico, coagulante, antimicrobiano e no controle dos níveis de glicose, lipídeos e colesterol no sangue (32, 35, 36). Mais recentemente, estudos demonstram ainda efeitos neuroprotetor, hepatoprotetor, gastroprotetor e cardioprotetor, decorrente das suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (33). O potencial antimicrobiano da *C. zeylanicum* é bem explorado na literatura, o qual evidencia ação frente a fungos, bactérias gram-positivas e gram-negativas, sendo a casca o material da planta mais utilizado nos estudos. O quadro 01 apresenta estudos que exploram o efeito antimicrobiano, enfatizando as características da espécie da planta utilizada, microrganismos testes e os respectivos achados. Embora seja consistente a comprovação de

atividade antifúngica de *Cinnamomum*, a maioria das investigações analisa produtos extraídos da casca e utiliza microrganismos na fase planctônica.

Diante das limitações dos antifúngicos convencionais no tratamento da candidose e dos mecanismos de resistência desenvolvidos pelos microrganismos, surge a necessidade de buscar novas alternativas terapêuticas. Neste contexto, as propriedades terapêuticas e disponibilidade de *C. zeylanicum* apontam para sua possível aplicação para tratamento da candidose. Assim, este estudo objetiva descrever a composição e investigar, *in vitro*, a atividade antifúngica e o mecanismo de ação do OE extraído de folhas de *Cinnamomum zeylanicum* Blume.

**Quadro 01.** Atividade antimicrobiana de *C. zeylanicum*.

Espécie	Parte da planta	Material utilizado	Componente majoritário (%)	Micro-organismos	Resultados	Referência
<i>C. zeylanicum</i>	Casca	OE	Cinamaldeído (68.95%)	21 espécies de bactérias e 4 espécies de fungos	CIM entre >40 – 1.120 µg/mL	(37)
<i>C. zeylanicum</i>	NR	Extrato etanólico	NR	<i>S.mutans</i> , <i>S. aureus</i> <i>E. faecalis</i> <i>S.bovis</i> <i>P.aeruginosa</i> , <i>S.typhimurium</i> <i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>C.albicans</i> .e Cepas multirresistentes: <i>E. coli</i> <i>K.pneumoniae</i> <i>C.albicans</i> .	CIM entre 19,5 – 6.250 µg/mL	(38)
<i>C. zeylanicum</i>	NR	OE	NR	Cepa multiresistente de <i>Acinetobacter</i> spp.	625 µg/mL	(39)
<i>C. zeylanicum</i>	Casca	OE	NR	<i>Helicobacter pylori</i>	Zona de inibição: 24,8 mm	(40)
<i>C. zeylanicum</i>	Casca	Extrato etanólico	NR	Isolados clínicos de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a Meticilina	CIM entre 64-256 µg/mL para as 12 cepas de <i>S. aureus</i>	(41)
<i>C. zeylanicum</i>	Casca	OE	NR	<i>P. aeruginosa</i> (NCIM5029); <i>S.aureus</i> (NCIM5021); <i>S. typhimurium</i> (NCIM2501) e	Zona de inibição: entre 8,66-32,33mm	(42)

				<i>Bacillus subtilis</i> (NCIM2063)		
<i>C. zeylanicum</i> <i>Breyn</i>	NR	OE	(Z) – Isoeugenol (93,30%)	<i>C. albicans</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. dubliniensis</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. krusei</i> suceptíveis e resistentes ao fluconazol	CIM entre 800- 1600 µg/mL para todas as cepas	(43)
<i>C. zeylanicum</i> <i>Blume</i>	Folha	OE	NR	<i>C. albicans</i> (CBS 562) <i>F. nucleatum</i> (ATCC 25586) <i>P. gingivalis</i> (ATCC 33277) <i>S. sanguis</i> (ATCC 10556) <i>S. mitis</i> (ATCC 903)	CIM entre 0,007- 1000 µg/mL	(44)
<i>C. zeylanicum</i> <i>Nees</i>	NR	OE	Cinamaldeído (66%)	<i>Malassezia furfur</i> <i>Candida albicans</i>	<i>M. furfur</i> : CIM = 250 µg/mL; <i>C. albicans</i> CIM=350µg/mL	(45)
<i>C. zeylanicum</i>	Casca	OE	Cinamaldeído (77,19%)	<i>Enterococcus</i> <i>faecalis</i> (ATCC 29212)	10 µg/mL	(46)
<i>C. zeylanicum</i>	Casca	Extrato aquoso e OE	NR	<i>S. auricularis</i> <i>Micrococcus spp</i> <i>A. lwoffii</i> <i>C. albicans</i>	Zona de inibição para o OE: 22,3- 45,6mm Zona de inibição para o extrato 11- 11,6mm	(47)
<i>C. verum</i>	Casca	OE	Cinamaldeído	<i>S. typhi</i> , <i>S. paratyphi A</i> <i>E. coli</i> <i>S. aureus</i> <i>P. fluorescens</i> <i>B. licheniformis</i>	CIM entre 2.9- 4.8 mg/mL para todos os microrganismos.	(48)
<i>C. camphora</i>	NR	OE	NR	<i>Streptococcus</i> <i>mutans</i> ATCC 25175	Zona de inibição de 12,51mm	(49)
<i>C. zeylanicum</i>	NR	Extrato etanólico	NR	<i>Enterococcus</i> <i>faecalis</i>	Média da zona de inibição de 5,467 mm na concentração de 20%.	(50)
<i>C. zeylanicum</i>	Casca	OE	NR	50 isolados clínicos de <i>M. hominis</i>	CIM <sub>90</sub> = 500 µg/mL	(51)

\*NR: Não referido no artigo

## CAPÍTULO 1

O manuscrito a seguir será submetido para publicação no periódico “Archives of Oral Biology”.

### ABSTRACT

**Objective:** Evaluate the antifungal activity and mode of action of the essential oil (EO) extracted from leaves of *Cinnamomum zeylanicum* Blume on *Candida* spp..

**Methods:** The EO from *C. zeylanicum* Blume leaves had the phytochemical profile determined by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry. Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC) were determined on reference strains of *Candida* spp. (ATCC and CBS) and clinical strains collected from oral cavity. The sorbitol and ergosterol assays were performed in order to determine the EO mode of action. Then, the growth inhibition kinetics of *C. albicans* in contact with EO in the MIC, MICx2 and MICx4 for 0h, 1h, 2h, 6h, 8h, 12h and 24h were evaluated. Finally, was analyzed its effect on the formation and reduction of *Candida* spp. biofilms. Data were statistically treated (Kruskal-Wallis, Dunn's *post hoc*,  $\alpha = 0,05$ )

**Results:** MIC and MFC values ranged from 62.5 to 1000  $\mu\text{g/mL}$ . With regard to the mode of action, the antifungal activity of *C. zeylanicum* Blume EO seems to be related to fungal cell wall biosynthesis pathways. The kinetics assay demonstrated that the antifungal activity of EO in the MIC occurs in 24h and in the MICx2 and MICx4 in 8h of contact. EO caused inhibition of the formation and reduction of mature mono- and multi-species biofilms of *Candida* spp..

**Conclusions:** The EO from *C. zeylanicum* Blume leaves has eugenol as the major component, demonstrated antifungal activity on planktonic cells and biofilms of *Candida* spp. and act on cell wall biosynthesis pathways.

**Key-words:** Candidiasis, Antifungal Agents, Biofilms, *Cinnamomum zeylanicum*.

## 1. INTRODUÇÃO

*Candida* spp. são microrganismos comensais e versáteis, colonizadores de até 70% da população sem sinais clínicos de infecção. Entretanto, alterações locais ou sistêmicas podem desencadear um desequilíbrio no hospedeiro e predispor o desenvolvimento da doença chamada candidose, podendo variar desde um envolvimento superficial e localizado a uma doença fatal quando disseminada no organismo de indivíduos imunocomprometidos (Singh, Verma, Murari, & Agrawal, 2014).

Para o tratamento de infecções fúngicas provocadas por *Candida* existem basicamente quatro classes de medicamentos: poliênicos, azóis, equinocandinas e os anti-metabólitos. Apesar das opções terapêuticas existentes o aumento da resistência microbiana frente a antifúngicos de diferentes classes é crescente (Anibal, Sardi, Peixoto, Moraes, & Höfling, 2010; Nunes, Nunes, Monteiro, & Paes, 2011; Paul & Moye-Rowley, 2014; Perfect, 2016; Pianalto & Alspaugh, 2016). Um dos mecanismos fortemente envolvidos com essa resistência é a habilidade de determinados microrganismos formarem biofilmes. Nestas comunidades, os microrganismos sofrem modificações genéticas que elevam a resistência aos fármacos e ao sistema imunológico. Para *Candida*, a habilidade em formar biofilme sobre superfícies bióticas e abióticas constitui um fator de virulência importante, se tornando um interessante objeto de estudo no desenvolvimento de agentes antifúngicos para a candidose (Cirasola et al., 2013; Morace, Perdoni, & Borghi, 2014; Ramage, Culshaw, Jones, & Williams, 2010; Seneviratne, Jin, & Samaranayake, 2008).

Neste contexto, o estudo das propriedades terapêuticas das plantas tem crescido por constituir um recurso terapêutico alternativo (Doddanna, Patel, Sundarrao, & Veerabhadrapa, 2013; Höfling et al., 2010; Newman & Cragg, 2012). Uma das plantas avaliadas ao longo do tempo como detentora de propriedades biológicas importantes é o *Cinnamomum*, conhecida popularmente como canela. Diversas partes da planta como casca, folhas, flores, frutos e raízes apresentam valor medicinal ou aplicação culinária. Materiais obtidos de partes diferentes da mesma planta variam significativamente na sua composição química, o que conduz a diferentes efeitos farmacológicos (Nabavi et al., 2015;

Ranasinghe et al., 2013; Rao & Gan, 2014; Vangalapati, Satya, Prakash, & Avanigadda, 2012).

Quanto às atividades biológicas de *Cinnamomum*, é descrito seu potencial como analgésico, antisséptico, anticâncer, antiespasmódico, coagulante, neuroprotetor, hepatoprotetor, gastroprotetor, cardioprotetor, antimicrobiano e no controle dos níveis cênicos, lipídicos e na redução do colesterol no sangue (Al-Dhubiab, 2012; Nabavi et al., 2015; Ranasinghe et al., 2013; Rao & Gan, 2014). Estudos que analisam o potencial antimicrobiano da *C. zeylanicum* evidenciam ação frente a fungos, bactérias gram-positivas e gram-negativas (Abbaszadegan et al., 2015; Guerra et al., 2012; Gupta et al., 2013; Naveed et al., 2013; Sleha et al., 2014). Embora exista comprovação de atividade antifúngica de *C. zeylanicum*, a maioria das investigações analisa produtos extraídos da casca e utiliza microrganismos na fase planctônica.

Diante disso, este estudo objetiva descrever a composição e investigar, *in vitro*, a atividade antifúngica e o mecanismo de ação do OE extraído de folhas de *Cinnamomum zeylanicum* Blume frente à *Candida* spp. na forma planctônica e de biofilmes.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

**2.1 Produto teste:** Óleo essencial das folhas de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Ferquima Ind. e Com., Vargem Grande, São Paulo, Brasil) extraído pelo método de hidrodestilação, com aparência, cor e odor característicos; densidade de 1,043 e índice de refração 1,533.

**2.2 Local de realização da pesquisa:** A análise química do OE foi realizada no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA) na Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Os ensaios microbiológicos foram realizados no Núcleo de Medicina Tropical (NUMETROP) do Centro de Ciências da Saúde da UFPB.

### **2.3 Análise fitoquímica por Cromatógrafo Gasoso acoplado a Espectrômetro de Massas (GCMS-QP2010 Ultra):**

O perfil dos constituintes voláteis foi determinado utilizando um Cromatógrafo Gasoso acoplado a espectrômetro de massas, modelo Shimadzu GCMS-QP2010, com coluna capilar RTX-5MS e fase estacionária de 5% fenil e 95% dimetilpolisiloxano com 30m de comprimento, 0,25mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme.

A programação de temperatura inicial foi de 60°C a 240°C (3°C/min). O tempo de programação da corrida foi de 60 minutos e a temperatura do forno do injetor de 250°C. O hélio foi utilizado como gás de arraste (fase móvel) a um fluxo de 1,0 mL/min, com razão de Split de 1:20 e o volume de injeção de 1µL. A ionização dos componentes foi realizada por impacto eletrônico a 70 eV, com detector de 1,25Kv. O espectrômetro foi operado no modo SCAN, varrendo uma faixa de massas de 40 a 500 u.m.a. A temperatura da fonte de íons foi de 250°C e a identificação dos compostos foi realizada comparando-se seus espectros de massa com os espectros existentes no banco de dados do equipamento.

A amostra do óleo essencial de *C. zeylanicum* Blume foi injetada a uma concentração de 2 ppm e o hexano foi utilizado como solvente. As análises do cromatograma e espectros de massa foram realizadas com auxílio da biblioteca do equipamento, empregando-se como parâmetros de integração o Width: 3 e o Slope: 2000.

### **2.4 Microrganismos:**

Foram utilizadas cepas fúngicas de referência de *Candida* spp. da Coleção Americana de Culturas - American Type Culture Collection (ATCC): *C. albicans* ATCC 60193, *C. albicans* ATCC 90029, *C. krusei* ATCC 34135, *C. tropicalis* ATCC 750; e da Coleção Holandesa - Central Bureau voor Schimmelcultures (CBS): *C. albicans* CBS 562 e *C. tropicalis* CBS 94. Além destas, foram utilizadas cepas clínicas coletadas da cavidade bucal que foram isoladas, identificadas e cedidas pelo Laboratório de Micologia Clínica do CCS/UFPB, sendo: *C. albicans* LM01, *C. albicans* LM03, *C. albicans* LM04, *C. tropicalis* LM05, *C. tropicalis* LM07 e *C. tropicalis* LM08.

**2.5 Concentração inibitória Mínima (CIM):** a CIM foi realizada pela técnica de microdiluição em placa de 96 poços (Standards, 2002). Para tanto, cada poço recebeu 100 µL de meio Caldo Sabouraud Dextrose (CSD) (KASVI<sup>®</sup>, Kasv Imp e Dist de Prod p/ Laboratorios LTDA, Curitiba, Brasil). O OE de *C. zeylanicum* Blume foi transferido (100 µL) para os primeiros poços da placa e realizou-se a diluição seriada para os poços subsequentes com as concentrações variando de 2000 a 15,62µg/mL. Os inóculos das cepas fúngicas foram preparados e ajustados em espectrofotômetro na concentração de  $5,0 \times 10^6$  UFC/mL (absorbância de 0,08 a 0,10 a 530nm), e, em seguida, diluídos para obter uma concentração final de  $2,5 \times 10^3$  UFC/mL após a inserção de 100 µL em cada poço. A nistatina (Sigma-Aldrich, São Paulo – SP, Brasil) foi utilizada como controle positivo com concentrações variando de 12 a 0,09 µg/mL. Foram realizados o controle de viabilidade das cepas e o controle de esterilidade do meio de cultura e do Tween 80, utilizado no preparo da emulsão do OE testado. As placas foram incubadas em estufa por 24h a 37°C e, em seguida, a leitura visual foi realizada (Standards, 2002). Para confirmação da presença de microrganismos viáveis foram inseridos 50 µL do corante 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio (TCT) em cada poço da placa e a mesma incubada novamente em estufa por 24h. O TCT reflete a atividade das enzimas desidrogenases envolvidas no processo de respiração celular, evidenciando com coloração vermelha a formação de aglomerados de células viáveis no fundo dos poços da placa (Deswal & Chand, 1997). O ensaio foi realizado em triplicata para cada cepa teste e repetido três vezes, em momentos distintos, com os mesmos critérios acima descritos. A CIM foi considerada a moda entre as menores concentrações do produto em teste capazes de inibir o crescimento dos microrganismos.

**2.6 Concentração Fungicida Mínima (CFM):** A partir dos resultados obtidos no ensaio para determinação da CIM, foram semeados 50 µL dos poços referentes à CIM e as duas concentrações imediatamente maiores (CIM x 2 e CIM x 4) em placas de Petri contendo Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) (KASVI<sup>®</sup>, Kasv Imp e Dist de Prod p/ Laboratorios LTDA, Curitiba, Brasil). As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 48h. A leitura visual foi realizada observando-se o crescimento fúngico no meio sólido. O teste foi realizado em triplicata e a CFM foi considerada a menor concentração capaz de inibir o crescimento visível do

subcultivo. Para determinar se a atividade do OE foi fungicida ou fungistática realizou-se a razão entre CFM e CIM, classificando-se como fungistática quando  $CFM/CIM \geq 4$  e fungicida quando  $CFM/CIM < 4$  (Siddiqui, Farooq, Musthafa, Ahmad, & Khan, 2013).

## **2.7 Mecanismo de ação do Óleo essencial:**

Estes ensaios indicam se o OE de *C. zeylanicum* Blume altera a estrutura da parede celular (teste do Sorbitol) da *Candida* spp. ou se atua modificando a permeabilidade iônica da membrana (teste do Ergosterol).

**2.7.1 Teste do sorbitol:** a técnica de microdiluição descrita no item 2.3.1. foi utilizada na ausência e presença do sorbitol. Foram selecionadas cepas referência de *C. albicans* (ATCC 60193 e CBS 562) e cepas clínicas de *C. albicans* (LM03 e LM04) e *C. tropicalis* (LM07 e LM08) e o preparo do inóculo foi realizado em meio CSD (KASVI<sup>®</sup>, Kasv Imp e Dist de Prod p/ Laboratorios LTDA, Curitiba, Brasil) suplementado com sorbitol (D- sorbitol Anidro - INLAB, São Paulo - SP) a uma concentração final de 0,8 M. Este atua como protetor osmótico e, portanto, indica ação sobre a parede celular fúngica quando o efeito da substância teste é reduzido em sua presença. As placas foram incubadas em estufa a 37°C e as leituras foram realizadas após 48 h de incubação (Escalante, Gattuso, Pérez, & Zacchino, 2008; Lima et al., 2013). A caspofungina (Diacetato de caspofungina - Sigma-Aldrich, São Paulo – SP) foi utilizada como controle positivo devido seu comprovado mecanismo de ação sobre a parede celular fúngica (Perlin, 2011; Pierce, Srinivasan, Uppuluri, Ramasubramanian, & López-Ribot, 2013). O teste foi realizado em triplicata e os controles de viabilidade das cepas e de esterilidade das substâncias e do meio foram conferidos. Foi considerada a CIM na presença de sorbitol a menor concentração da substância capaz de inibir visivelmente o crescimento fúngico, e mecanismo de ação via parede celular quando a CIM da substância teste na presença de sorbitol foi superior a CIM na sua ausência.

**2.7.2 Teste do ergosterol:** Para determinar se o mecanismo de ação está relacionado com o ergosterol da membrana, a técnica de microdiluição descrita no

item 2.3.1 foi utilizada na ausência e presença de ergosterol exógeno (Sigma-Aldrich, São Paulo – SP) na concentração de 400 µg/mL. Os inóculos das cepas *C. albicans* ATCC 60193 e *C. tropicalis* ATCC 750 foram preparados com meio de cultura CSD acrescidos de ergosterol (400 µg/mL). As placas foram incubadas em estufa a 37°C e as leituras realizadas após 48 h (Escalante et al., 2008; Lima et al., 2013). Os controles positivos utilizados neste teste foram a nistatina (Sigma-Aldrich, São Paulo – SP) e anfotericina B (Sigma-Aldrich, São Paulo – SP), que possuem ação comprovada sobre a membrana celular fúngica, por meio da ligação aos esteroides presentes na mesma, causando alteração na sua permeabilidade (Perlin, 2011; Pierce et al., 2013). Os controles de esterilidade e de viabilidade das cepas também foram realizados. Foi considerada a CIM na presença de ergosterol a menor concentração da substância capaz de inibir visivelmente o crescimento fúngico, e mecanismo de ação via membrana quando a CIM da substância teste na presença de ergosterol foi superior a CIM na sua ausência.

## **2.8 Avaliação da cinética de inibição do OE de *C. zeylanicum* Blume sobre crescimento fúngico**

O estudo da interferência da substância teste no crescimento e multiplicação das células fúngicas de *C. albicans* ATCC 60193 foi realizado pelo método de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) (de Castro, de Oliveira Lima, de Almeida Freires, & Alves, 2013; Leite, Bezerra, Sousa, Guerra, & Lima, 2014). Foi avaliado o efeito das concentrações da substância referentes à CIM, CIM x 2 e CIM x 4 sobre o crescimento do microrganismo em diferentes intervalos de tempo: T0 (inicial); T1 (1 hora), T2 (2 horas); T6 (6 horas); T8 (8 horas); T12 (12 horas) e T24 (24 h).

Para o cultivo do microrganismo sobre efeito da substância utilizou-se o mesmo protocolo proposto na microdiluição em placa de 96 poços (Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2002). Em seguida, 10 µL do conteúdo dos poços foram semeados em placas de Petri contendo ASD (KASVI<sup>®</sup>, Kasv Imp e Dist de Prod p/ Laboratorios LTDA, Curitiba, Brasil), nos intervalos de tempo pré-definidos, e as mesmas foram incubadas a 37 °C por 24 h para posterior contagem de UFC. Decorrida a incubação, foi realizada a contagem visual do

número de unidades formadoras de colônias e os valores foram transformados em  $\log_{10}$  UFC/mL e apresentados na forma de curva de morte das células fúngicas. A Nistatina foi utilizada como controle positivo e os controles de crescimento da cepa testada e controle de esterilidade do meio de cultura foram verificados.

## **2.9 Avaliação da atividade antimicrobiana do OE de *C. zeylanicum* Blume sobre o biofilme monoespécie e multiespécie de *Candida* spp.**

Este ensaio demonstrou o efeito do OE de *C. zeylanicum* Blume sobre duas fases de desenvolvimento do biofilme: em formação e biofilme maduro (48h). Para ambas, foram utilizados três tipos de biofilme: monoespécie de *C. albicans* ATCC 60193, monoespécie de *C. tropicalis* ATCC 750 e multiespécie de *C. albicans* ATCC 60193 e *C. tropicalis* ATCC 750.

### **2.9.1 Avaliação da atividade antimicrobiana do OE de *C. zeylanicum* Blume sobre a formação do biofilme de *Candida* spp.**

O teste do efeito do OE sobre a formação do biofilme foi conduzido em placas de 96 poços com fundo chato (CRAL artigos para laboratório LTDA, Cotia-SP, Brasil). Cada poço recebeu 100  $\mu$ L de meio CSD (KASVI<sup>®</sup>, Kasv Imp e Dist de Prod p/ Laboratorios LTDA, Curitiba, Brasil). A solução de OE de *C. zeylanicum* Blume foi transferida (100  $\mu$ L) para os primeiros poços da placa e diluída seriadamente nos poços subsequentes, de forma que as concentrações variaram de 1000 a 7,81  $\mu$ g/mL. A nistatina foi utilizada como controle positivo com concentrações entre 100 e 0,78  $\mu$ g/mL. Em seguida, os inóculos das cepas, preparados em meio CSD suplementado com sacarose a 2% e ajustados em espectrofotômetro (BioPet Technologies – 722G) a  $2.5 \times 10^5$  UFC/mL, foram transferidos para as placas, sendo 100 $\mu$ L para o biofilme monoespécie e 50 $\mu$ L de cada cepa (*C. albicans* ATCC 60193 e *C. tropicalis* ATCC 750) para o biofilme multiespécie, de modo a atingir os 100 $\mu$ L totais. A placa foi incubada por 48h a 37 °C.

### **2.9.2 Quantificação da biomassa de biofilme**

Decorrido o tempo de incubação, o meio foi aspirado das placas e as células não aderidas foram removidas com a lavagem dos poços duas vezes com 200 µL de tampão fosfato-salino (PBS) e secagem a temperatura ambiente por 45 min. Em cada poço foram acrescentados 100 µL de solução aquosa de cristal violeta a 0,4%, que permaneceu em contato com o biofilme por 45 min. Após a incorporação do corante, os poços foram lavados três vezes com 200 µL de água destilada e imediatamente descorados por 45min com 200 µL de etanol a 95%. Por fim, 100 µL da solução descorada foram transferidos para uma nova placa e a absorbância mensurada a 600 nm no leitor de microplacas GloMax®-Multi Detection System - Promega (Djordjevic, Wiedmann, & McLandsborough, 2002).

Os valores de absorbância do OE e do controle de crescimento foram utilizados para calcular a porcentagem de inibição da formação do biofilme, sendo o controle de crescimento considerado 100% da formação fúngica.

Os ensaios foram realizados em triplicata. Os controles de esterilidade do ensaio não receberam a suspensão de células e os controles de crescimento contiveram meio de cultura e as cepas correspondentes a cada tipo de biofilme.

### **2.9.3 Avaliação da atividade antimicrobiana do OE de *C. zeylanicum* Blume na redução do biofilme maduro de *C. albicans***

Placas de 96 poços com fundo chato foram utilizadas para a inoculação de 200 µL das suspensões fúngicas de cada tipo de biofilme, cultivadas em meio CSD (KASVI<sup>®</sup>, Kasv Imp e Dist de Prod p/ Laboratorios LTDA, Curitiba, Brasil) suplementado com sacarose a 2% e ajustados a  $2.5 \times 10^5$  UFC/mL. Após o cultivo, as placas foram incubadas por 48h em estufa a 37 °C para formação do biofilme maduro. Após as 48h, o meio de cultura foi removido da placa e os poços foram lavados com 200 µL de PBS para que apenas o biofilme aderido permanecesse nas placas. A solução do OE de *C. zeylanicum* Blume (100 µL), foi transferida para as placas com biofilme maduro, com concentrações variando de 1000 a 7,81 µg/mL. A nistatina foi utilizada como controle positivo com concentrações entre 100 e 0,78 µg/mL. Para esse teste, foram formados dois grupos distintos quanto ao tempo incubação, e, portanto, tempo de contato com o

OE: G1- 24h de incubação em estufa a 37 °C e G2- 48h de incubação em estufa a 37 °C.

#### **2.9.4 Quantificação da biomassa de biofilme**

Decorrido o tempo de incubação de cada grupo, as placas foram preparadas para leitura e a redução do biofilme maduro foi quantificada aplicando-se a mesma técnica descrita no item 2.9.2.

#### **2.10 Análise estatística**

Inicialmente foi realizada uma análise exploratória para determinar o teste estatístico mais apropriado para cada ensaio. As diferenças significativas entre os controles e a substância teste nos ensaios de cinética e biofilme foram determinadas pelo teste de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn ( $\alpha = 0,05$ ) utilizando o software Graphpad Prism version 7.0 (San Diego, CA, USA).

### **3 RESULTADOS**

#### **3.1 Perfil cromatográfico e identificação dos compostos do OE de *C. zeylanicum* Blume**

A composição química do OE de *C. zeylanicum* Blume é descrita na Tabela 01. Vinte e seis componentes foram identificados, representando 100% de sua composição, sendo o eugenol o componente majoritário (68.96%) e os outros componentes distribuídos em concentrações menores que 3,5%. A análise dos constituintes indica a presença de compostos voláteis, principalmente compostos aromáticos e terpênicos.

**Tabela 01.** Identificação dos compostos do OE de *C. zeylanicum* Blume por CG-EM.

RTIME (min)	Nome do composto	Área (%)
5.942	Alfa-pineno	1,12
6.178	Hydroperoxide, 1-ethylbutyl	0,50

6.370	Canfeno	0,24
6.450	Hidroperóxido	0.62
7.189	Beta-pineno	0.32
8.037	Alfa-felandreno	0.94
8.725	p-cimeno	1.00
8.890	Beta-felandreno	0.65
11.566	Linalol	2.70
19.084	(E)-cinamaldeido	1.17
19.898	1,3-Benzodioxole,5-(2-propenyl)-	1.30
23.029	Eugenol	68.96
23.758	Alfa-copaeno	0.60
25.667	Cariofileno	3.54
26.714	2-Propen-1-ol, 3-phenyl-, Acetate	1.30
27.127	Alfa-humuleno	0.61
30.176	Acetato de eugenila	2.04
32.516	Óxido de cariofileno	1.01
35.798	1-Dodecanol	0.61
39.431	Benzoato de benzila	3.29
40.895	Methoxyacetic acid, dodecyl ester	0.46
43.306	n-Heptadecanol-1	0.97
46.185	Ácido n-hexadecanoico	2.18
50.043	1-Octadecanol	1.74
52.552	Ácido eicosanoico	1.33
58.368	9-Octadecenamide, (Z)-	0.81
		100.00

RTime: Tempo de retenção

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

Os valores de CIM e CFM do OE de *C. zeylanicum* Blume e do antifúngico padrão, nistatina, estão expressos na tabela 02. Para o OE, a CIM e CFM estiveram entre 125 e 1000 µg/mL, sendo a *C. krusei* ATCC 60193 a cepa mais resistente. Os veículos utilizados na emulsão do OE (água destilada e tween 80) não afetaram o crescimento das cepas fúngicas. A razão CFM/CIM demonstrou

que o OE apresenta um efeito fungicida para todas as espécies de *Candida* testadas (Siddiqui et al., 2013).

**Tabela 02.** Atividade antifúngica do OE de *C. zeylanicum* Blume sobre *Candida* spp. (valores de CIM e CFM expressos em µg/mL)

Cepa	O.E <i>C. zeylanicum</i> Blume			Nistatina		
	CIM	CFM	Razão CFM/CIM	CIM	CFM	Razão CFM/CIM
<i>C. albicans</i> CBS 562	250	250	1	0,75	1,5	2
<i>C. albicans</i> ATCC 60193	250	250	1	0,375	0,75	2
<i>C. krusei</i> ATCC 3413	1000	1000	1	3	3	1
<i>C. tropicalis</i> CBS 94	250	500	2	1,5	1,5	1
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	250	500	2	0,75	0,75	1
<i>C. albicans</i> ATCC 90029	125	125	1	*	*	*
<i>C. albicans</i> LM01	250	250	1	*	*	*
<i>C. albicans</i> LM03	250	250	1	3	6	2
<i>C. albicans</i> LM04	500	500	1	3	3	1
<i>C. tropicalis</i> LM05	250	250	1	*	*	*
<i>C. tropicalis</i> LM07	250	250	1	3	6	2
<i>C. tropicalis</i> LM08	62,5	125	2	<0,093	*	*

\* Não testada

### 3.3 Mecanismo de ação do OE de *C. zeylanicum* Blume

Os valores apresentados na Tabela 03 demonstram que as propriedades antifúngicas do OE estão relacionadas com as vias de biossíntese da parede celular fúngica, uma vez que a CIM na presença do sorbitol foi superior à CIM na ausência dele em todas as cepas testadas, com exceção da *C. albicans* LM04. A caspofungina, utilizada como controle positivo, teve aumento na CIM em pelo menos quatro vezes na presença de sorbitol sobre todas as cepas testes.

O ensaio para determinação da CIM na presença de ergosterol sugere que, para a espécie *C. tropicalis*, o OE atua fracamente na permeabilidade iônica da membrana celular, enquanto frente à cepa de *C. albicans*, esse efeito não foi verificado já que a presença do ergosterol no meio não levou ao aumento da CIM. Os controles nistatina e anfotericina B confirmaram o mecanismo de ação conhecido (Tabela 04).

**Tabela 03.** Valores da CIM do OE de *C. zeylanicum* Blume e da caspofungina na ausência e na presença do sorbitol(0,8M).

Cepa	OE <i>C. zeylanicum</i>		Caspofungina	
	CIM (µg/mL)	CIM com sorbitol (µg/mL)	CIM (µg/mL)	CIM com sorbitol (µg/mL)
<i>C. albicans</i> CBS 562	250	500	< 0,039	>5
<i>C. albicans</i> ATCC 60193	250	500	< 0,039	> 5
<i>C. albicans</i> LM03	250	500	<0,078	5
<i>C. albicans</i> LM04	500	500	<0,078	10
<i>C. tropicalis</i> LM07	250	500	<0,078	10
<i>C. tropicalis</i> LM08	62,5	500	<0,078	1,25

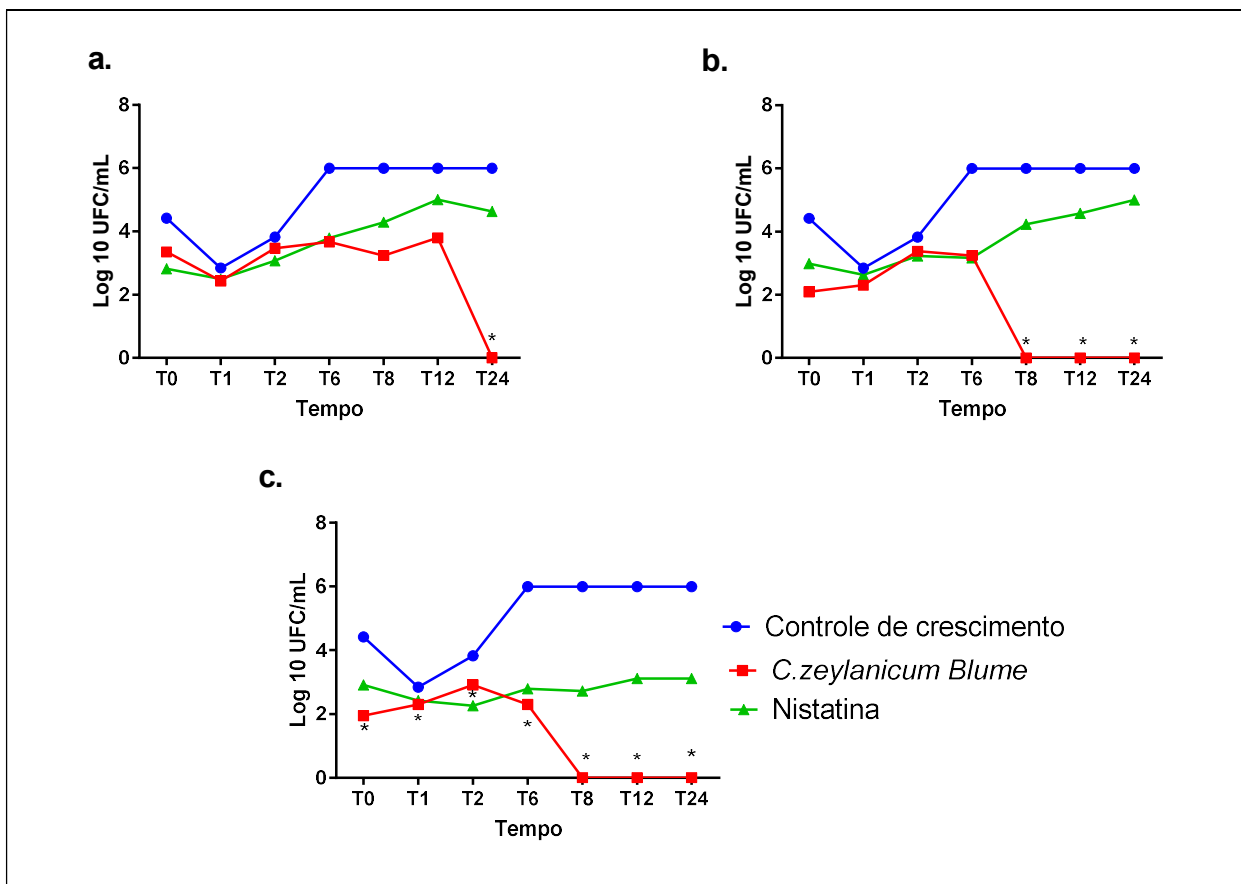
**Tabela 04.** Efeito do ergosterol exógeno (400µg/mL) na CIM do OE de *C. zeylanicum* Blume frente a cepas de *C. albicans* CBS 562 e *C. tropicalis* ATCC 750 (valores expressos em µg/mL).

Cepa	OE <i>C. zeylanicum</i>		Nistatina		Anfotericina B	
	CIM	CIM com ergosterol	CIM	CIM com ergosterol	CIM	CIM com ergosterol
<i>C. albicans</i> ATCC 60193	250	250	0,375	3	<0,5	31,25
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	250	500	0,75	6	<0,5	15,62

### 3.4 Avaliação da cinética de inibição do OE de *C. zeylanicum* Blume sobre crescimento fúngico

O OE de *C. zeylanicum* Blume interferiu na multiplicação e crescimento de *C. albicans* ATCC 60193 em todas as concentrações testadas (250 µg/mL, 500 µg/mL e 1000 µg/mL), com reduções significativas do crescimento fúngico evidenciadas a partir do teste de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn ( $\alpha = 0,05$ ). Na CIM, os fungos foram completamente eliminados após 24h de contato com o

OE, enquanto que na CIMx2 e CIMx4 foram necessárias oito horas de ação para obter o mesmo efeito (Figura 01).

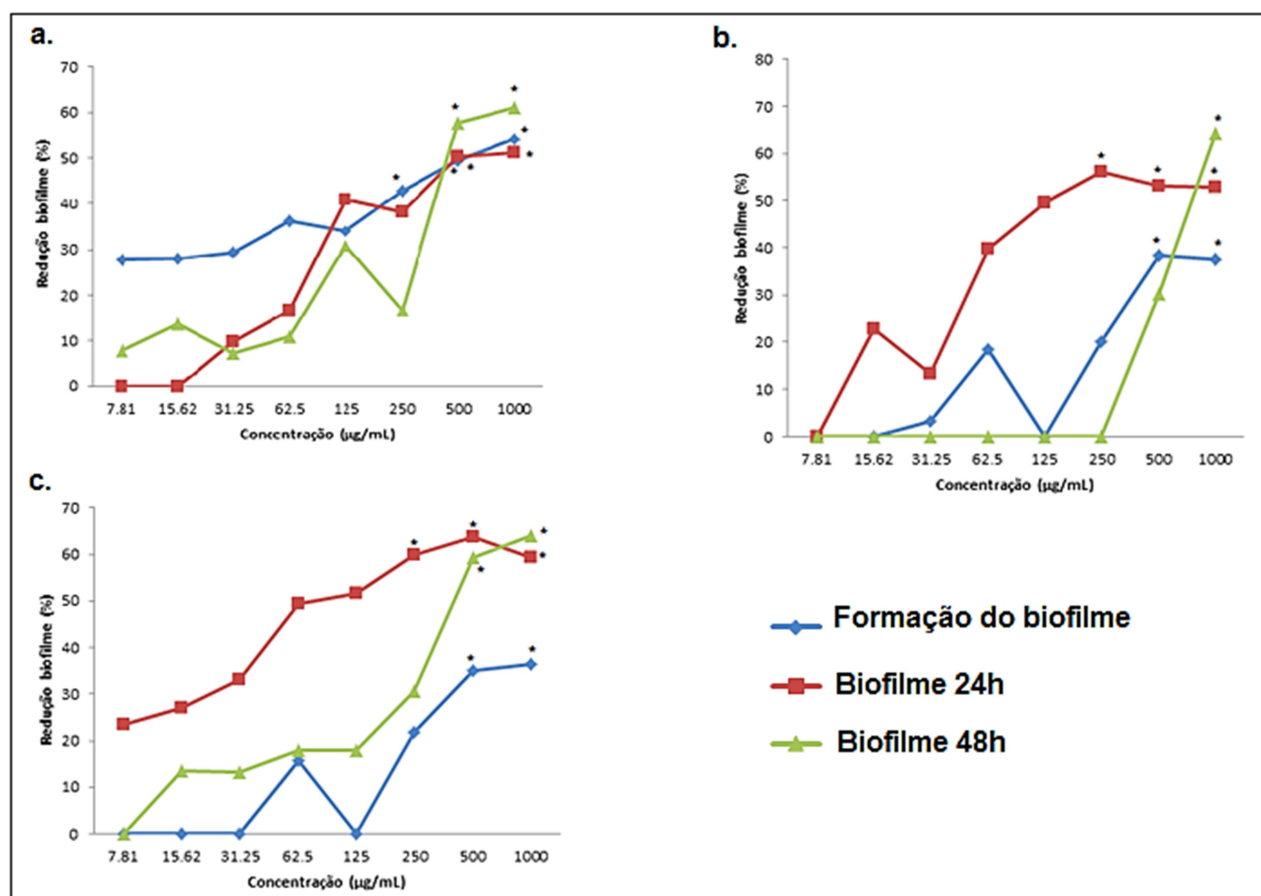


**Figura 01:** Interferência do OE de *C. zeylanicum* Blume (250 µg/mL) e da Nistatina no crescimento e multiplicação de *C. albicans* ATCC 60193. Concentrações: **a** – CIM: canela (250 µg/mL) / nistatina (0,375 µg/mL); **b** – CIMx2: canela (500 µg/mL) / nistatina (0,750 µg/mL); **c** – CIMx4 canela (1000 µg/mL) / nistatina (1,5 µg/mL). \*Redução significativa das UFC (Kruskal-Wallis com *post hoc* de Dunn,  $P < 0,05$ ).

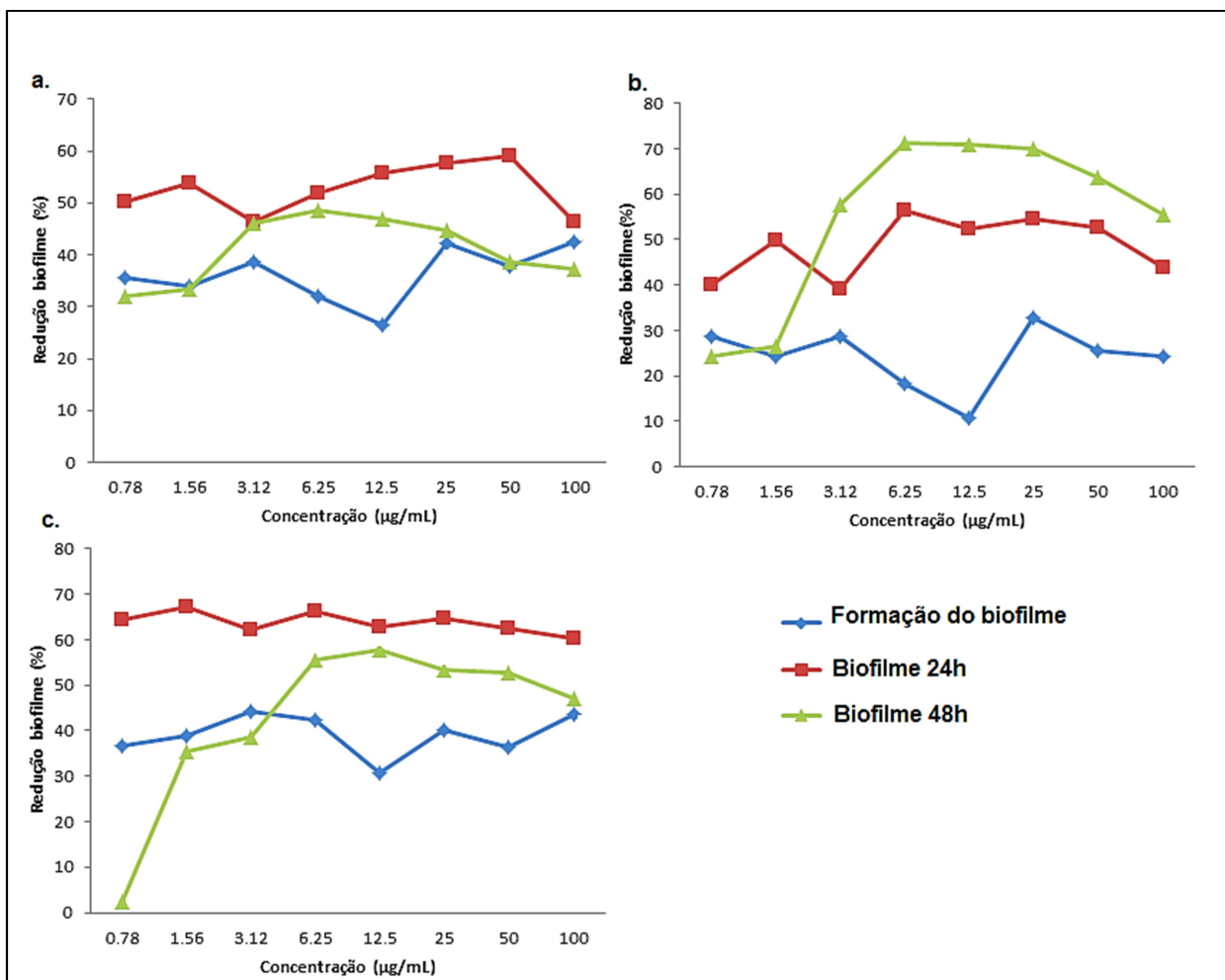
### 3.5 Efeito do OE de *C. zeylanicum* Blume sobre biofilme mono e multiespécie de *Candida* spp.

O OE de *C. zeylanicum* Blume apresentou atividade de inibição da formação do biofilme mono e multiespécie de *Candida* spp., bem como de redução do biofilme maduro nos dois grupos testados (24h e 48h). Os melhores resultados foram encontrados na redução do biofilme maduro no período de 24h de ação do OE, onde menores concentrações (250 µg/mL) foram capazes de inibir significativamente os biofilmes monoespécie de *C. tropicalis* ATCC 750

( $P=0.0017$ ) e o multiespécie de *Candida* spp ( $P=0.0081$ ). A concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$  provocou redução significativa em todas as fases de desenvolvimento e tipos de biofilme, com exceção do biofilme maduro de *Candida tropicalis* ATCC 750 sobre 48h de ação do OE (Figura 02). Os resultados da nistatina estão expressos na Figura 03.



**Figura 02.** Efeito inibitório do OE de *C. zeylanicum* Blume na formação e redução (G1: 24h de contato o OE; G2: 48h de contato com o OE) do biofilme maduro de: **a:** *Candida albicans* ATCC 60193; **b:** *Candida tropicalis* ATCC 750 e **c:** multiespécie de *Candida* spp. (*Candida albicans* ATCC 60193 e *Candida tropicalis* ATCC 750). \*Redução significativa do biofilme (Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn,  $P < 0,05$ ).



**Figura 03.** Efeito inibitório da Nistatina na formação e redução (G1: 24h de contato o OE; G2: 48h de contato com o OE) do biofilme maduro de: **a:** *Candida albicans* ATCC 60193; **b:** *Candida tropicalis* ATCC 750 e **c:** multiespécie de *Candida* spp. (*Candida albicans* ATCC 60193 e *Candida tropicalis* ATCC 750). \*Redução significativa do biofilme (Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn,  $P < 0,05$ ).

## 4 DISCUSSÃO

A crescente limitação dos antifúngicos empregados atualmente no tratamento da candidose, associada à alta prevalência da doença e ao comprovado potencial antimicrobiano dos óleos essenciais encontrados em espécies vegetais (Bersan et al., 2014; Millezi, Piccoli, Oliveira, & Pereira, 2016; RANA, SINGH, & GWAL, 2011), incitou a presente investigação do efeito antifúngico do OE de *C. zeylanicum* Blume sobre células planctônicas e sobre biofilme de *Candida* spp., bem como de possíveis mecanismos de ação envolvidos com esse efeito.

A análise química do OE extraído das folhas de *C. zeylanicum* Blume utilizado neste estudo está de acordo com a literatura, evidenciando o eugenol como componente majoritário (68.96%) (Jantan, Karim Moharam, Santhanam, & Jamal, 2008; Millezi et al., 2016) e mais outros 25 componentes químicos distribuídos em concentrações menores.

Os produtos naturais são considerados potentes inibidores da atividade microbiana quando os valores das CIM's são iguais ou inferiores a 500 µg/mL (Duarte et al., 2007). Destarte, os resultados apresentados neste estudo revelam que o OE de *C. zeylanicum* Blume é um potente antifúngico para todas as cepas testadas, com exceção da *C. krusei* ATCC 3413 em que o efeito pode ser classificado como moderado, porém essa espécie também demonstra essa característica frente a antifúngicos consolidados (Pfaller et al., 2004). A razão CFM/CIM aponta para um efeito fungicida do OE (Siddiqui et al., 2013) tanto para as cepas de coleção como para as clínicas. Estudos que confirmam o efeito do OE de *Cinnamomun* sobre *Candida* spp. são relatados na literatura (Bersan et al., 2014; Ferhout, Bohatier, Guillot, & Chalchat, 1999; Jantan et al., 2008; Parthasarathy & Thombare, 2013; Unlu, Ergene, Unlu, Zeytinoglu, & Vural, 2010), porém, existem variações importantes entre os estudos como: espécie de *Cinnamomun*, o material da planta utilizado, o método de verificação da sensibilidade fúngica e alguns não esclarecem de que parte da planta o OE foi extraído. Essas diferenças dificultam a comparação já que a mesma planta pode produzir óleos com componentes majoritários diferentes a depender da parte da planta utilizada e que diferentes espécies de um determinado gênero também levam a OE's com composições químicas variadas, resultando em efeitos biológicos distintos (Nabavi et al., 2015; Ranasinghe et al., 2013). Cepas de *Candida* de origem clínica e multirresistentes a drogas amplamente utilizadas na prática clínica também demonstram susceptibilidade a ação de *Cinnamomum* em outras investigações (Khan et al., 2009; Pozzatti et al., 2008).

A atividade antifúngica observada na CIM e CFM pode ser atribuída à complexa combinação de componentes voláteis, particularidade dos OE que conferem diferentes atividades biológicas em humanos, animais e plantas. Esta atividade pode ser caracterizada por dois ou três componentes majoritários, que

apresentam concentrações elevadas em relação aos outros constituintes (Adorjan & Buchbauer, 2010; Bakkali, Averbeck, Averbeck, & Idaomar, 2008).

É relevante observar que a literatura comprova a atividade antifúngica do eugenol, componente majoritário do OE utilizado nesse estudo, sobre células planctônicas e biofilmes em formação e maduro de *Candida* spp. (Abrão et al., 2015; de Souza et al., 2014; Doke, Raut, Dhawale, & Karuppaiyil, 2014). Um estudo de correlação entre a atividade antifúngica do OE de *C. zeylanicum* Blume e seus componentes químicos, atribui ao eugenol o forte efeito antifúngico encontrado sobre cepas de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* (CIM's entre 0,31 e 0,63 µg/mL) (Jantan et al., 2008). Entretanto, deve ser destacado que a mesma investigação, ao comparar a CIM do O.E com o isolado de eugenol, demonstra um discreto aumento da CIM do isolado, sugerindo que outros componentes, mesmo em pequenas concentrações, agem sinergicamente e contribuem com o efeito antifúngico do OE. Assim, é possível depreender que o eugenol constituiu o principal responsável pelo efeito antifúngico observado nesse estudo, porém outros constituintes como o cinamaldeído, linalol, benzoato de benzila, alfa pineno e beta pineno também devem colaborar com esse efeito, uma vez que a atividade antifúngica desses constituintes isolados também é comprovada (Ferhout et al., 1999; Jantan et al., 2008; Rajput & Karuppaiyil, 2013; Silva et al., 2012).

Para auxiliar na compreensão do efeito antifúngico demonstrado nos testes de CIM e CFM, foi realizado o ensaio para verificação da influência do OE na cinética do crescimento fúngico. Este demonstrou que, para três concentrações avaliadas (CIM, CIMx2 e CIMx4), o efeito do OE sobre *C. albicans* passa a ser perceptível a partir de 8h de contato e que 24h são suficientes para que ocorra o efeito antifúngico do OE. Não foram encontrados na literatura outros estudos que avaliassem o efeito do OE extraído das folhas de *C. zeylanicum* Blume no crescimento e desenvolvimento de *Candida*.

O estudo do mecanismo de ação dos antifúngicos é uma estratégia importante para limitar a aparecimento de resistência aos agentes atualmente disponíveis, bem como para o desenvolvimento de drogas mais potentes e seguras contra infecções (Freires, Denny, Benso, de Alencar, & Rosalen, 2015; Lopes, Pinto, Andrade, & Valentão, 2013). Apesar disso, não foram encontrados

na literatura estudos que investiguem o mecanismo de ação do OE de *C. zeylanicum* Blume frente a cepas de *Candida* spp. Neste estudo, os achados revelam que a ação antifúngica do OE parece estar relacionada com as vias de biossíntese da parede celular fúngica, porém não é possível concluir que existe interferência na permeabilidade iônica da membrana celular via ligação com o ergosterol, visto que apenas uma das espécies testadas (*C. tropicalis* ATCC 750) aumentou a CIM em duas vezes na presença do ergosterol exógeno. Considerando o discreto aumento da CIM na presença do protetor osmótico (Sorbitol) e a composição complexa do OE, sugere-se que a atividade antifúngica do OE apresenta outros mecanismos além dos apontados nesse estudo. Considerando que o efeito antifúngico do eugenol, componente majoritário do OE, sobre *Candida* spp. está relacionado com a sensibilização da biossíntese do ergosterol, o estudo desta via pode ser uma promissora hipótese para novas investigações (Ahmad, Khan, Manzoor, & Khan, 2010).

Além da capacidade do OE de *C. zeylanicum* Blume agir sobre células planctônicas de *Candida* spp., observou-se também um interessante potencial antifúngico sobre biofilme de *Candida* spp. em diferentes fases de formação. Na concentração de 500 µg/mL, foi observada redução de 34,94% a 49,42% na formação do biofilme de *Candida* spp. Sobre o biofilme maduro, a concentração de 500 µg/mL do OE reduziu pelo menos 50% de todos os tipos de biofilme testados, com exceção do biofilme de *C. tropicalis* que sofreu redução da sua biomassa em 30,2% após 48h de ação do OE. Diante desses achados, é possível constatar que o potencial do OE de *C. zeylanicum* Blume em reduzir biofilmes já formados é superior à sua capacidade de inibir o processo de formação da comunidade microbiana na forma de biofilme. Com essa característica, a aplicação farmacológica desse OE aponta para o uso como antifúngico em pacientes acometidos pela candidose, portanto com biofilme formado, e não como agente preventivo da doença, onde atuaria na inibição da aderência dos microrganismos.

É válido destacar ainda que a concentração de 250 µg/mL do OE durante 24h de ação provocou reduções estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ) no biofilme maduro de dois dos três tipos de biofilme testados (monoespécie de *C. tropicalis* e multiespécie de *Candida* spp.) e que todas as fases de formação do

biofilme de *Candida* foram sensíveis ao OE na concentração de 500 µg/mL, sendo esta uma possível concentração para o desenvolvimento de medicamentos à base do OE de *C. zeylanicum* Blume.

Estudos demonstrando o efeito antimicrobiano do OE de *C. zeylanicum* Blume sobre biofilmes são escassos na literatura. Apenas um verificou a ação sobre *Candida* e não foram encontrados estudos utilizando o OE de *C. zeylanicum* Blume extraído das folhas da planta (Abbaszadegan et al., 2015; Kim, Lee, Kim, Baek, & Lee, 2015; Millezi et al., 2016; Pires et al., 2011). Pires et al. (32), analisaram o efeito do OE de *C. zeylanicum* sobre a formação e redução do biofilme de *C. parapsilosis* e *C. albicans* e observaram redução completa da formação do biofilme na concentração de 250 µg/mL e 125 µg/mL, respectivamente. A redução do biofilme maduro (24h de formação) foi analisada a partir de valores de concentração inibitória mínima do biofilme, resultando em 1000 µg/mL e 2000 µg/mL, para a *C. parapsilosis* e *C. albicans*, respectivamente. Apesar do estudo não esclarecer que parte da planta foi utilizada para produção do OE, pode-se presumir que a extração foi feita da casca, visto que o perfil fitoquímico demonstrou o cinemaldeído como componente majoritário (Nabavi et al., 2015; Ranasinghe et al., 2013), o que pode justificar as diferenças em relação ao presente estudo onde a extração foi feita da folha e o eugenol foi o componente majoritário. Este, o eugenol, também foi avaliado quanto à capacidade de inibir a formação e provocar redução de biofilme maduro (24h de formação) de *C. albicans*, sendo capaz de inibir em 70% o desenvolvimento do biofilme a 500 µg/mL e de ser efetivo na redução do biofilme maduro a 1000 µg/mL (Doke et al., 2014).

A susceptibilidade de biofilmes de outros microrganismos como *Enterococcus faecalis* (Abbaszadegan et al., 2015), *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* (Millezi et al., 2016) e *P. aeruginosa* (Kim et al., 2015), também foram relatados na literatura. Ainda que escassos, os estudos que investigam o efeito do OE de *C. zeylanicum* sobre microrganismos na forma de biofilme demonstram ser promissora sua aplicação em doenças infecciosas.

Apesar dos estudos *in vitro* utilizando produtos naturais para tratamento da candidose serem numerosos e os resultados serem otimistas, verifica-se um baixo nível de evidência científica que se configura pelas grandes diferenças metodológicas, seja no *design* do estudo ou na escolha do tipo de extrato e das

concentrações utilizadas nos testes (Ferreira et al., 2015). Com isso, investiga-se muito e se avança pouco nas possibilidades de tratamento dessa doença. O OE de *C. zeylanicum* Blume, utilizado nesse estudo, é mais um produto natural com potencial de aplicação clínica para tratamento da candidose, sendo fundamental o aprofundamento dessa investigação com estudos *in vitro* de toxicidade e ensaios clínicos para suportar a formulação de um antifúngico a base de OE de *C. zeylanicum* Blume.

## **5 CONCLUSÃO**

O OE das folhas de *C. zeylanicum* Blume possui o eugenol como componente majoritário, apresenta atividade antifúngica sobre células planctônicas e biofilmes mono e multiespécie de *Candida* spp., atuando nas vias de biossíntese da parede celular. As propriedades antifúngicas demonstradas pelo OE das folhas de *C. zeylanicum* Blume encorajam a realização de investigações sobre sua toxicidade e ensaios clínicos fase I e II vislumbrando a utilização em infecções fúngicas bucais.

## 6 REFERÊNCIAS

- Abbaszadegan, A., Dadolahi, S., Gholami, A., Moein, M., Hamedani, S., Ghasemi, Y., & Abbott, P. (2015). Antimicrobial and Cytotoxic Activity of *Cinnamomum zeylanicum*, Calcium Hydroxide, and Triple Antibiotic Paste as Root Canal Dressing Materials. *The journal of contemporary dental practice*, 17(2), 105-113.
- Abrão, P. H. O., Pizi, R. B., Souza, T. B., Silva, N. C., Fregnan, A. M., Silva, F. N., Dias, D. F. (2015). Synthesis and biological evaluation of new eugenol mannich bases as promising antifungal agents. *Chemical biology & drug design*, 86(4), 459-465.
- Adorjan, B., & Buchbauer, G. (2010). Biological properties of essential oils: an updated review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(6), 407-426.
- Ahmad, A., Khan, A., Manzoor, N., & Khan, L. A. (2010). Evolution of ergosterol biosynthesis inhibitors as fungicidal against *Candida*. *Microbial pathogenesis*, 48(1), 35-41.
- Al-Dhubiab, B. E. (2012). Pharmaceutical applications and phytochemical profile of *Cinnamomum burmannii*. *Pharmacognosy reviews*, 6(12), 125.
- Anibal, P. C., Sardi, J. d. C. O., Peixoto, I. T. A., Moraes, J. J. d. C., & Höfling, J. F. (2010). Conventional and alternative antifungal therapies to oral candidiasis. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(4), 824-831.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
- Bersan, S. M., Galvão, L. C., Goes, V. F., Sartoratto, A., Figueira, G. M., Rehder, V. L., Duarte, M. C. (2014). Action of essential oils from Brazilian native and exotic medicinal species on oral biofilms. *BMC complementary and alternative medicine*, 14(1), 1.
- Cirasola, D., Sciota, R., Vizzini, L., Ricucci, V., Morace, G., & Borghi, E. (2013). Experimental biofilm-related *Candida* infections. *Future microbiology*, 8(6), 799-805.
- de Castro, R. D., de Oliveira Lima, E., de Almeida Freires, I., & Alves, L. A. (2013). Combined effect of *Cinnamomum zeylanicum* Blume essential oil and nystatin on *Candida albicans* growth and micromorphology. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 12(2), 149-156.
- de Souza, T. B., Orlandi, M., Coelho, L. F. L., Malaquias, L. C. C., Dias, A. L. T., de Carvalho, R. R., Carvalho, D. T. (2014). Synthesis and *in vitro* evaluation of antifungal and cytotoxic activities of eugenol glycosides. *Medicinal Chemistry Research*, 23(1), 496-502.
- Deswal, D., & Chand, U. (1997). Standardization of the tetrazolium test for viability estimation in ricebean (*Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi & ohashi) seeds. *Seed Science and Technology*, 25(3), 409-417.
- Djordjevic, D., Wiedmann, M., & McLandsborough, L. (2002). Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and environmental microbiology*, 68(6), 2950-2958.
- Doddanna, S. J., Patel, S., Sundarrao, M. A., & Veerabhadrapa, R. S. (2013). Antimicrobial activity of plant extracts on *Candida albicans*: An *in vitro* study. *Indian Journal of Dental Research*, 24(4), 401.
- Doke, S. K., Raut, J. S., Dhawale, S., & Karuppayil, S. M. (2014). Sensitization of *Candida albicans* biofilms to fluconazole by terpenoids of plant origin. *The Journal of general and applied microbiology*, 60(5), 163-168.
- Duarte, M. C. T., Leme, E. E., Delarmelina, C., Soares, A. A., Figueira, G. M., & Sartoratto, A. (2007). Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. *Journal of ethnopharmacology*, 111(2), 197-201.
- Escalante, A., Gattuso, M., Pérez, P., & Zacchino, S. (2008). Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. *Journal of natural products*, 71(10), 1720-1725.

- Ferhout, H., Bohatier, J., Guillot, J., & Chalchat, J. (1999). Antifungal activity of selected essential oils, cinnamaldehyde and carvacrol against *Malassezia furfur* and *Candida albicans*. *Journal of Essential Oil Research*, *11*(1), 119-129.
- Ferreira, G. L. S., Pérez, A. L. A. d. L., Rocha, Í. M., Pinheiro, M. A., Castro, R. D. d., Carlo, H. L., Castellano, L. R. (2015). Does Scientific Evidence for the Use of Natural Products in the Treatment of Oral Candidiasis Exist? A Systematic Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.
- Freires, I. A., Denny, C., Benso, B., de Alencar, S. M., & Rosalen, P. L. (2015). Antibacterial activity of essential oils and their isolated constituents against cariogenic bacteria: a systematic review. *Molecules*, *20*(4), 7329-7358.
- Guerra, F. Q. S., Mendes, J. M., Sousa, J. P. d., Morais-Braga, M. F., Santos, B. H. C., Melo Coutinho, H. D., & Lima, E. d. O. (2012). Increasing antibiotic activity against a multidrug-resistant *Acinetobacter* spp. by essential oils of *Citrus limon* and *Cinnamomum zeylanicum*. *Natural product research*, *26*(23), 2235-2238.
- Gupta, A., Duhan, J., Tewari, S., Sangwan, P., Yadav, A., Singh, G., Saini, H. (2013). Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of *Syzygium aromaticum*, *Ocimum sanctum* and *Cinnamomum zeylanicum* plant extracts against *Enterococcus faecalis*: A preliminary study. *International endodontic journal*, *46*(8), 775-783.
- Höfling, J., Anibal, P., Obando-Pereda, G., Peixoto, I., Furletti, V., Foglio, M., & Gonçalves, R. (2010). Antimicrobial potential of some plant extracts against *Candida* species. *Brazilian Journal of Biology*, *70*(4), 1065-1068.
- Jantan, I. b., Karim Moharam, B. A., Santhanam, J., & Jamal, J. A. (2008). Correlation between chemical composition and antifungal activity of the essential oils of eight *Cinnamomum* species. *Pharmaceutical Biology*, *46*(6), 406-412.
- Khan, R., Islam, B., Akram, M., Shakil, S., Ahmad, A. A., Ali, S. M., . . . Khan, A. U. (2009). Antimicrobial activity of five herbal extracts against multi drug resistant (MDR) strains of bacteria and fungus of clinical origin. *Molecules*, *14*(2), 586-597.
- Kim, Y.-G., Lee, J.-H., Kim, S.-I., Baek, K.-H., & Lee, J. (2015). Cinnamon bark oil and its components inhibit biofilm formation and toxin production. *International journal of food microbiology*, *195*, 30-39.
- Leite, M. C. A., Bezerra, A. P. d. B., Sousa, J. P. d., Guerra, F. Q. S., & Lima, E. d. O. (2014). Evaluation of antifungal activity and mechanism of action of citral against *Candida albicans*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014.
- Lima, I. O., Pereira, F. d. O., Oliveira, W. A. d., Lima, E. d. O., Menezes, E. A., Cunha, F. A., & Diniz, M. d. F. F. M. (2013). Antifungal activity and mode of action of carvacrol against *Candida albicans* strains. *Journal of Essential Oil Research*, *25*(2), 138-142.
- Lopes, G., Pinto, E., Andrade, P. B., & Valentão, P. (2013). Antifungal activity of phlorotannins against dermatophytes and yeasts: approaches to the mechanism of action and influence on *Candida albicans* virulence factor. *PLoS One*, *8*(8), e72203.
- Millezi, A. F., Piccoli, R. H., Oliveira, J. M., & Pereira, M. O. (2016). Anti-biofilm and Antibacterial Effect of Essential Oils and Their Major Compounds. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, *19*(3), 624-631.
- Morace, G., Perdoni, F., & Borghi, E. (2014). Antifungal drug resistance in *Candida* species. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, *2*(4), 254-259.
- Nabavi, S. F., Di Lorenzo, A., Izadi, M., Sobarzo-Sánchez, E., Daglia, M., & Nabavi, S. M. (2015). Antibacterial effects of cinnamon: from farm to food, cosmetic and pharmaceutical industries. *Nutrients*, *7*(9), 7729-7748.
- Naveed, R., Hussain, I., Tawab, A., Tariq, M., Rahman, M., Hameed, S., Iqbal, M. (2013). Antimicrobial activity of the bioactive components of essential oils from Pakistani spices against *Salmonella* and other multi-drug resistant bacteria. *BMC complementary and alternative medicine*, *13*(1), 1.

- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod*, 75(3), 311-335. doi:10.1021/np200906s
- Nunes, E. B., Nunes, N. B., Monteiro, J. C. M. S., & Paes, A. L. V. (2011). Perfil de sensibilidade do gênero *Candida* a antifúngicos em um hospital de referência da Região Norte do Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 2(4), 23-30.
- Parthasarathy, H., & Thombare, S. (2013). Evaluation of antimicrobial activity of *Azadirachta indica*, *Syzygium aromaticum* and *Cinnamomum zeylanicum* against oral microflora. *Asian Journal of Experimental Sciences*, 27(2), 13-16.
- Paul, S., & Moye-Rowley, W. S. (2014). Multidrug resistance in fungi: regulation of transporter-encoding gene expression. *Frontiers in physiology*, 5, 143.
- Perfect, J. R. (2016). Is there an emerging need for new antifungals? *Expert opinion on emerging drugs*, 1-3.
- Perlin, D. S. (2011). Current perspectives on echinocandin class drugs. *Future microbiology*, 6(4), 441-457.
- Pfaller, M., Messer, S., Boyken, L., Rice, C., Tendolkar, S., Hollis, R., & Diekema, D. (2004). Cross-resistance between fluconazole and ravuconazole and the use of fluconazole as a surrogate marker to predict susceptibility and resistance to ravuconazole among 12,796 clinical isolates of *Candida* spp. *Journal of clinical microbiology*, 42(7), 3137-3141.
- Pianalto, K. M., & Alspaugh, J. A. (2016). New Horizons in Antifungal Therapy. *Journal of Fungi*, 2(4), 26.
- Pierce, C. G., Srinivasan, A., Uppuluri, P., Ramasubramanian, A. K., & López-Ribot, J. L. (2013). Antifungal therapy with an emphasis on biofilms. *Current opinion in pharmacology*, 13(5), 726-730.
- Pires, R. H., Montanari, L. B., Martins, C. H. G., Zaia, J. E., Almeida, A. M. F., Matsumoto, M. T., & Mendes-Giannini, M. J. S. (2011). Anticandidal efficacy of *cinnamon* oil against planktonic and biofilm cultures of *Candida parapsilosis* and *Candida orthopsilosis*. *Mycopathologia*, 172(6), 453-464.
- Pozzatti, P., Scheid, L. A., Spader, T. B., Atayde, M. L., Santurio, J. M., & Alves, S. H. (2008). *In vitro* activity of essential oils extracted from plants used as spices against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible *Candida* spp. *Canadian journal of microbiology*, 54(11), 950-956.
- Rajput, S. B., & Karuppayil, S. M. (2013). Small molecules inhibit growth, viability and ergosterol biosynthesis in *Candida albicans*. *SpringerPlus*, 2(1), 1.
- Ramage, G., Culshaw, S., Jones, B., & Williams, C. (2010). Are we any closer to beating the biofilm: novel methods of biofilm control. *Current opinion in infectious diseases*, 23(6), 560-566.
- Rana, I. S., Singh, A., & Gwal, R. (2011). *In vitro* study of antibacterial activity of aromatic and medicinal plants essential oils with special reference to *cinnamon* oil. *Seeds*, 1, 4.
- Ranasinghe, P., Pigera, S., Premakumara, G. S., Galappaththy, P., Constantine, G. R., & Katulanda, P. (2013). Medicinal properties of 'true' *cinnamon* (*Cinnamomum zeylanicum*): a systematic review. *BMC complementary and alternative medicine*, 13(1), 1.
- Rao, P. V., & Gan, S. H. (2014). *Cinnamon*: a multifaceted medicinal plant. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014.
- Seneviratne, C., Jin, L., & Samaranyake, L. (2008). Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. *Oral diseases*, 14(7), 582-590.
- Siddiqui, Z. N., Farooq, F., Musthafa, T. M., Ahmad, A., & Khan, A. U. (2013). Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. *Journal of Saudi Chemical Society*, 17(2), 237-243.
- Silva, A. C. R. d., Lopes, P. M., Azevedo, M. M. B. d., Costa, D. C. M., Alviano, C. S., & Alviano, D. S. (2012). Biological activities of  $\alpha$ -pinene and  $\beta$ -pinene enantiomers. *Molecules*, 17(6), 6305-6316.
- Singh, A., Verma, R., Murari, A., & Agrawal, A. (2014). Oral candidiasis: An overview. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 18(4), 81.

- Sleha, R., Mosio, P., Vydrzalova, M., Jantovska, A., Bostikova, V., & Mazurova, J. (2014). *In vitro* antimicrobial activities of *cinnamon* bark oil, anethole, carvacrol, eugenol and guaiazulene against *Mycoplasma hominis* clinical isolates. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub*, *158*, 208-211.
- Standards, N. C. f. C. L. (2002). *Reference Methods for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast: Approved Standar*: National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- Unlu, M., Ergene, E., Unlu, G. V., Zeytinoglu, H. S., & Vural, N. (2010). Composition, antimicrobial activity and *in vitro* cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). *Food and Chemical Toxicology*, *48*(11), 3274-3280.
- Vangalapati, M., Satya, S., Prakash, S., & Avanigadda, S. (2012). A review on pharmacological activities and clinical effects of *cinnamon* species. *Research Journal of pharmaceutical, biological and chemical sciences*, *3*(1), 653-663.

### 3 CONCLUSÃO

Com base nos resultados, pode-se concluir que:

- 1) A análise dos constituintes indica a presença de compostos voláteis, principalmente compostos aromáticos e terpênicos e o eugenol foi o componente majoritário;
- 2) O OE das folhas de *C. zeylanicum* Blume apresenta forte atividade antifúngica sobre *Candida* spp. ;
- 3) O OE de *C. zeylanicum* Blume atua, possivelmente, nas vias de biossíntese da parede celular;
- 4) O OE de *C. zeylanicum* Blume possui efeito sobre a formação e redução do biofilme mono e multiespecie de *C. albicans* spp.

## 4 REFERÊNCIAS\*

1. Pianalto KM, Alspaugh JA. New Horizons in Antifungal Therapy. *Journal of Fungi*. 2016;2(4):26.
2. Campoy S, Adrio JL. Antifungals. *Biochemical Pharmacology*. 2016.
3. Nunes EB, Nunes NB, Monteiro JCMS, Paes ALV. Perfil de sensibilidade do gênero *Candida* a antifúngicos em um hospital de referência da Região Norte do Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*. 2011;2(4):23-30.
4. Mímica LMJ, Ueda SMY, Martino MDV, Navarini A, Martini IJ. Diagnóstico de infecção por *Candida*: avaliação de testes de identificação de espécies e caracterização do perfil de suscetibilidade. *J Bras Patol Med Lab*. 2009;45(1):17-23.
5. Marol S, Yücesoy M. Molecular epidemiology of *Candida* species isolated from clinical specimens of intensive care unit patients. *Mycoses*. 2008;51(1):40-9.
6. Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *Journal of Prosthodontics*. 2011;20(4):251-60.
7. Diekema D, Arbefeville S, Boyken L, Kroeger J, Pfaller M. The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2012;73(1):45-8.
8. Singh A, Verma R, Murari A, Agrawal A. Oral candidiasis: An overview. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*. 2014;18(4):81.
9. Armstrong AW, Bukhalo M, Blauvelt A. A Clinician's Guide to the Diagnosis and Treatment of Candidiasis in Patients with Psoriasis. *American Journal of Clinical Dermatology*. 2016;17(4):329-36.
10. Banerjee M, Uppuluri P, Zhao XR, Carlisle PL, Vipulanandan G, Villar CC, et al. Expression of UME6, a key regulator of *Candida albicans* hyphal development, enhances biofilm formation via Hgc1-and Sun41-dependent mechanisms. *Eukaryotic cell*. 2013;12(2):224-32.
11. Wächtler B, Wilson D, Haedicke K, Dalle F, Hube B. From attachment to damage: defined genes of *Candida albicans* mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells. *PLoS one*. 2011;6(2):e17046.
12. Pierce CG, Srinivasan A, Uppuluri P, Ramasubramanian AK, López-Ribot JL. Antifungal therapy with an emphasis on biofilms. *Current opinion in pharmacology*. 2013;13(5):726-30.
13. Taff HT, Nett JE, Zarnowski R, Ross KM, Sanchez H, Cain MT, et al. A *Candida* biofilm-induced pathway for matrix glucan delivery: implications for drug resistance. *PLoS Pathog*. 2012;8(8):e1002848.
14. Le Bars P, Kouadio AA, N'goran JK, Badran Z, Soueidan A. Relationship between removable prosthesis and some systemics disorders. *The Journal of Indian Prosthodontic Society*. 2015;15(4):292.
15. Pfaller M, Diekema D. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical microbiology reviews*. 2007;20(1):133-63.
16. Dangi YS, Soni ML, Namdeo KP. Oral candidiasis: A review. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2010;2(4):36-41.
17. Bassetti M, Peghin M, Timsit J-F. The current treatment landscape: candidiasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2016;71(suppl 2):ii13-ii22.
18. Perfect JR. Is there an emerging need for new antifungals? Expert opinion on emerging drugs. 2016:1-3.
19. Anibal PC, Sardi JdCO, Peixoto ITA, Moraes JdC, Höfling JF. Conventional and alternative antifungal therapies to oral candidiasis. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2010;41(4):824-31.
20. Paul S, Moye-Rowley WS. Multidrug resistance in fungi: regulation of transporter-encoding gene expression. *Frontiers in physiology*. 2014;5:143.
21. Morace G, Perdoni F, Borghi E. Antifungal drug resistance in *Candida* species. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2014;2(4):254-9.

22. Ramage G, Culshaw S, Jones B, Williams C. Are we any closer to beating the biofilm: novel methods of biofilm control. *Current opinion in infectious diseases*. 2010;23(6):560-6.
23. Seneviratne C, Jin L, Samaranyake L. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. *Oral diseases*. 2008;14(7):582-90.
24. Cirasola D, Sciota R, Vizzini L, Ricucci V, Morace G, Borghi E. Experimental biofilm-related *Candida* infections. *Future microbiology*. 2013;8(6):799-805.
25. Roemer T, Krysan DJ. Antifungal drug development: challenges, unmet clinical needs, and new approaches. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2014;4(5):a019703.
26. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod*. 2012;75(3):311-35.
27. Doddanna SJ, Patel S, Sundarrao MA, Veerabhadrapa RS. Antimicrobial activity of plant extracts on *Candida albicans*: An *in vitro* study. *Indian Journal of Dental Research*. 2013;24(4):401.
28. Höfling J, Anibal P, Obando-Pereda G, Peixoto I, Furletti V, Foglio M, et al. Antimicrobial potential of some plant extracts against *Candida* species. *Brazilian Journal of Biology*. 2010;70(4):1065-8.
29. Menezes TOA, Alves ACBA, dos Santos Vieira JM, de Menezes SAF, Alves BP, de Mendonça LCV. Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. *Revista de Odontologia da UNESP*. 2009;38(3):184-91.
30. Adorjan B, Buchbauer G. Biological properties of essential oils: an updated review. *Flavour and Fragrance Journal*. 2010;25(6):407-26.
31. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*. 2008;46(2):446-75.
32. Ranasinghe P, Pigera S, Premakumara GS, Galappaththy P, Constantine GR, Katulanda P. Medicinal properties of ‘true’ cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*): a systematic review. *BMC complementary and alternative medicine*. 2013;13(1):1.
33. Nabavi SF, Di Lorenzo A, Izadi M, Sobarzo-Sánchez E, Daglia M, Nabavi SM. Antibacterial effects of cinnamon: from farm to food, cosmetic and pharmaceutical industries. *Nutrients*. 2015;7(9):7729-48.
34. Vangalapati M, Satya S, Prakash S, AvaniGadda S. A review on pharmacological activities and clinical effects of *cinnamon* species. *Research Journal of pharmaceutical, biological and chemical sciences*. 2012;3(1):653-63.
35. Rao PV, Gan SH. Cinnamon: a multifaceted medicinal plant. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2014;2014.
36. Al-Dhubiab BE. Pharmaceutical applications and phytochemical profile of *Cinnamomum burmannii*. *Pharmacognosy reviews*. 2012;6(12):125.
37. Unlu M, Ergene E, Unlu GV, Zeytinoglu HS, Vural N. Composition, antimicrobial activity and *in vitro* cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). *Food and Chemical Toxicology*. 2010;48(11):3274-80.
38. Khan R, Islam B, Akram M, Shakil S, Ahmad AA, Ali SM, et al. Antimicrobial activity of five herbal extracts against multi drug resistant (MDR) strains of bacteria and fungus of clinical origin. *Molecules*. 2009;14(2):586-97.
39. Guerra FQS, Mendes JM, Sousa JPd, Morais-Braga MF, Santos BHC, Melo Coutinho HD, et al. Increasing antibiotic activity against a multidrug-resistant *Acinetobacter* spp. by essential oils of *Citrus limon* and *Cinnamomum zeylanicum*. *Natural product research*. 2012;26(23):2235-8.
40. Hosseini Z, Moghadam S, Ebrahimi F, Abdollahi M, Zahedi M, Nazari M, et al. *In vitro* screening of selected Iranian medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *International Journal of Green Pharmacy*. 2011;5(4):282.
41. Mandal S, DebMandal M, Saha K, Pal NK. *In vitro* antibacterial activity of three Indian spices against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Oman Med J*. 2011;26(5):319-23.
42. Rana IS, Singh A, Gwal R. *In vitro* study of antibacterial activity of aromatic and medicinal plants essential oils with special reference to *cinnamon* oil. *Seeds*. 2011;1:4.

43. Pozzatti P, Scheid LA, Spader TB, Atayde ML, Santurio JM, Alves SH. *In vitro* activity of essential oils extracted from plants used as spices against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible *Candida* spp. Canadian journal of microbiology. 2008;54(11):950-6.
44. Bersan SM, Galvão LC, Goes VF, Sartoratto A, Figueira GM, Rehder VL, et al. Action of essential oils from Brazilian native and exotic medicinal species on oral biofilms. BMC complementary and alternative medicine. 2014;14(1):1.
45. Ferhout H, Bohatier J, Guillot J, Chalchat J. Antifungal activity of selected essential oils, cinnamaldehyde and carvacrol against *Malassezia furfur* and *Candida albicans*. Journal of Essential Oil Research. 1999;11(1):119-29.
46. Abbaszadegan A, Dadolahi S, Gholami A, Moein M, Hamedani S, Ghasemi Y, et al. Antimicrobial and Cytotoxic Activity of *Cinnamomum zeylanicum*, Calcium Hydroxide, and Triple Antibiotic Paste as Root Canal Dressing Materials. The journal of contemporary dental practice. 2015;17(2):105-13.
47. Parthasarathy H, Thombare S. Evaluation of antimicrobial activity of *Azadirachta indica*, *Syzygium aromaticum* and *Cinnamomum zeylanicum* against oral microflora. Asian Journal of Experimental Sciences. 2013;27(2):13-6.
48. Naveed R, Hussain I, Tawab A, Tariq M, Rahman M, Hameed S, et al. Antimicrobial activity of the bioactive components of essential oils from Pakistani spices against *Salmonella* and other multi-drug resistant bacteria. BMC complementary and alternative medicine. 2013;13(1):1.
49. Chaudhari LKD, Jawale BA, Sharma S, Kumar HSM, Kulkarni PA. Antimicrobial activity of commercially available essential oils against *Streptococcus mutans*. The Journal of Contemporary Dental Practice. 2012;13(1):71-4.
50. Gupta A, Duhan J, Tewari S, Sangwan P, Yadav A, Singh G, et al. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of *Syzygium aromaticum*, *Ocimum sanctum* and *Cinnamomum zeylanicum* plant extracts against *Enterococcus faecalis*: A preliminary study. International endodontic journal. 2013;46(8):775-83.
51. Sleha R, Mosio P, Vydrzalova M, Jantovska A, Bostikova V, Mazurova J. *In vitro* antimicrobial activities of *cinnamon* bark oil, anethole, carvacrol, eugenol and guaiazulene against *Mycoplasma hominis* clinical isolates. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2014;158:208-11.

---

\* De acordo com as normas do PPGO/UFPB, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors - Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.