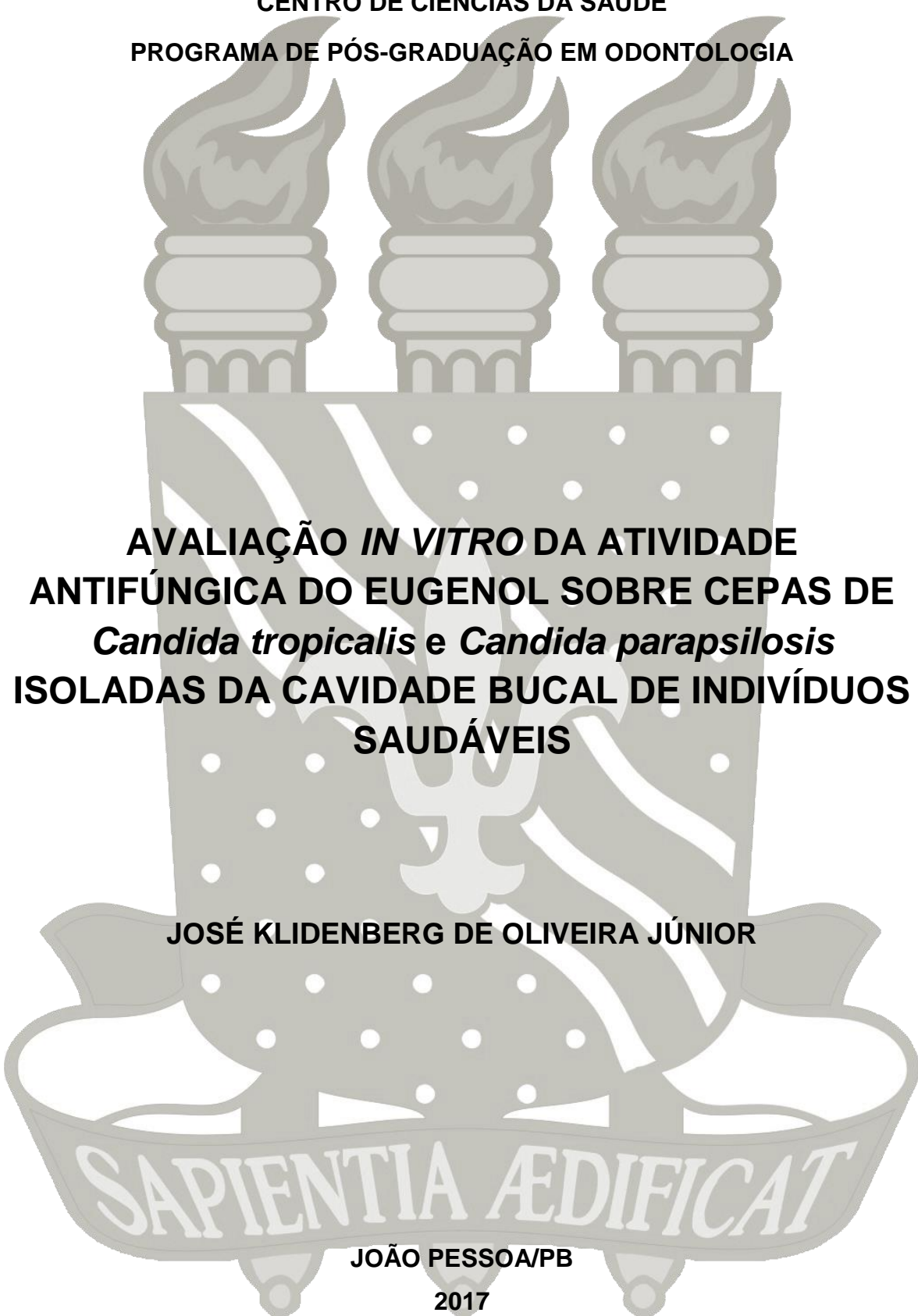


UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE  
ANTIFÚNGICA DO EUGENOL SOBRE CEPAS DE  
*Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*  
ISOLADAS DA CAVIDADE BUCAL DE INDIVÍDUOS  
SAUDÁVEIS**

**JOSÉ KLIDENBERG DE OLIVEIRA JÚNIOR**

**SAPIENTIA AEDIFICAT**

**JOÃO PESSOA/PB**

**2017**

JOSÉ KLIDENBERG DE OLIVEIRA JÚNIOR

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE  
ANTIFÚNGICA DO EUGENOL SOBRE CEPAS DE  
*Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*  
ISOLADAS DA CAVIDADE BUCAL DE INDIVÍDUOS  
SAUDÁVEIS**

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. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima

João Pessoa/PB

2017

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

O48a Oliveira-Júnior, Jose Klinderberg de.  
Avaliação in vitro da atividade antifúngica do eugenol sobre cepas de *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* isoladas da cavidade bucal de indivíduos saudáveis / Jose Klinderberg de Oliveira-Júnior. - João Pessoa, 2017.  
71 f.

Orientação: Edeltrudes de Oliveira Lima.  
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Fitoterapia; Candidíase Bucal; Eugenol. I. Lima, Edeltrudes de Oliveira. II. Título.

UFPB/BC

**JOSÉ KLIDENBERG DE OLIVEIRA JÚNIOR**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO EUGENOL SOBRE  
CEPAS DE *CANDIDA TROPICALIS* E *CANDIDA PARAPSILOSIS* ISOLADAS  
DA CAVIDADE BUCAL DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS**

Banca Examinadora



---

Profa. Dra. Edetrudes de Oliveira Lima  
Orientadora



---

Prof. Dr. Yuri Wanderley Cavalcanti  
Examinador - PPGO



---

Profa. Dra. Jozinete Vieira Pereira  
Examinador Externo

## DEDICATÓRIA

As pessoas que compuseram a amostra estudada sobre a qual me concentrei desejando, sobretudo, a melhoria de suas vidas.

A minha Avó Materna Edite Rodrigues Durand (*in memoriam*)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela dádiva da vida e por proporcionar saúde e paz e uma vida repleta de felicidade com a oportunidade de tornar muito dos meus sonhos realidade.

A minha orientadora Profa. Edeltrudes de Oliveira Lima, pessoa simples, profissional competente e de uma sabedoria de vida imensa. Obrigado pela maneira objetiva, eficaz e carinhosa com que a senhora conduziu esta pesquisa. Quero agradecer, em especial pela confiança, que desde do início depositou em mim, sem dúvidas seu incentivo e confiança fizeram grande diferença no meu desempenho. MUITO OBRIGADO!!

A minha mãe Irene, que nunca mediu esforços para me ajudar durante toda minha formação. Serei eternamente grato pelo apoio ilimitado e amor incondicional. Obrigado por todos os anos de dedicação, você é fundamental na minha vida.

As minhas irmãs Yarla e Yarlina, pela simples existência de vocês ao meu lado! Amo vocês!!

A todos os meus familiares, a família é e sempre será a base mantenedora da fé, esperança e fraternidade. Obrigada pela existência de vocês na minha vida.

Ao meu tio Humberto, Luciana, e sua mãe Carmem, pela acolhida nos meus primeiros meses na cidade de João Pessoa. Deixo aqui um agradecimento especial.

Aos membros da Banca Examinadora do Mestrado Prof<sup>o</sup> André Ulisses e Profa. Jozinete Vieira, pela presença e soma de conhecimentos direcionados ao trabalho de dissertação. São pessoas que tenho forte admiração.

À Universidade Federal da Paraíba, em especial, ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFPB pela oportunidade de ter realizado meu curso de mestrado.

A minha turma de mestrado, formada por profissionais competentes e determinados no que fazem. Em especial a Lanne Pinhiero, Pedro Everton, Taisa

Mara, José Cordeiro, Bruno Sousa, Julliana Palhano e Ana Cláudia. Sucesso a todos!!!

A todos os Professores que compõe o Programa de Pós-Graduação de Odontologia da UFPB, a dedicação diária a pesquisa científica é fonte inspiradora para todos nós.

Aos mestres da odontologia da Universidade Federal de Campina Grande, instituição que tenho bastante respeito e apreço, onde tive a oportunidade de fazer meu curso de graduação e tornar cirurgião-dentista.

A todos os meus professores, do maternal até os dias de hoje. Expresso meus profundos agradecimentos por essa profissão admirável que tem arte de dominar o saber e através da educação transformar a vida das pessoas. Parabéns professores, em especial, o do Brasil, vocês são verdadeiros HERÓIS !!

Aos amigos de laboratório Jeffersson Rodrigues, Daianne Sousa e em especial minha companheira de bancada laboratorial Daniele, por toda presteza e auxílio na realização dos experimentos desta pesquisa. Tenho enorme admiração pela sua garra e seriedade, Dani.

A Ana Luiza Perez, por toda ajuda e disponibilidade no início da pesquisa.

Aos amigos que a vida me presenteou Mariana Xerez, Luiz Eduardo, Marisley Layrtha, Manoela Natacha, Gabriella Nóbrega, Vinícius Sampaio, vocês são mais especiais do que posso colocar em palavras. Vocês tem um lugar cativo no meu coração.

A Matheus Alves, obrigado pelos meses de convivência, pelos momentos vivenciados juntos e pelas risadas duradouras mesmo em situação de caos.

Aos amigos de longa data Pablo Roberto, Paulo Andrade, Thays Martins, Sérgia Landara, Roberta Medeiros, Narjara Sampaio e Rayssa Batista. Vocês são fantásticos!

Ao meu amigo-irmão Luan Éverton, pelo incentivo e está presente nas adversidades e alegria, saiba que tenho uma forte admiração pelo ser humano e profissional que és. Somos irmãos de maternidades diferentes.

As minhas irmãs que o mestrado presenteou Rebeca Dantas e Priscilla Leite. Obrigado pelos momentos de descontração nas horas vagas e pelo braço amigo na hora do trabalho, vocês moram no meu coração.

Aos funcionários da UFPB, por garantirem o funcionamento desta grande instituição.

As comunidades envolvidas no projeto de extensão SaudeArte, o qual tive a oportunidade de participar durante os dois de mestrado e realizar parte da minha pesquisa. Saúde e Arte para todos!!

A todos aqueles que de algum modo auxiliaram na conclusão deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo o apoio financeiro durante os 24 meses do mestrado.

Muito obrigado a todos e que Deus abençoe incondicionalmente vocês!!!!

## EPÍGRAFE

*“A vida é assim: esquenta e esfria,  
aperta e daí afrouxa,  
sossega e depois desinquieta.  
O que ela quer da gente é coragem.  
O que Deus quer é ver a gente  
aprendendo a ser capaz  
de ficar alegre a mais,  
no meio da alegria,  
e inda mais alegre  
ainda no meio da tristeza!”*

**Grande Sertão: Veredas – João Guimarães Rosa**

## RESUMO

O gênero *Candida* normalmente possui uma relação de comensalismo na cavidade bucal, fatores modificadores podem alterar essa relação de forma direta ou indiretamente, tornando-o patogênico, desencadeando a candidíase. Os produtos provenientes de plantas medicinais vêm constituindo uma alternativa terapêutica, amplamente utilizada no tratamento da candidíase. Objetivou-se isolar e identificar cepas de *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* da cavidade bucal de indivíduos saudáveis, através da macro e micromorfologia, provas fisiológicas e bioquímicas. Avaliou-se a sensibilidade *in vitro* dessas cepas frente ao eugenol e a nistatina, através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM); Concentração Fungicida Mínima (CFM) e curva de morte, micromorfologia e estudo de associação (*checkboxboard*). Utilizaram-se oito cepas de *Candida tropicalis*, uma cepa padronizada (ATCC 13803) e sete de origem clínica e seis cepas clínicas de *Candida parapsilosis* e sua padrão (ATCC 22019). Observou-se atividade antifúngica do eugenol sobre as espécies ensaiadas, sendo determinada a CIM/CFM de 64 µg/mL para *Candida tropicalis*. A relação CFM/CIM indica atividade fungicida frente a 87,5% das cepas testadas. Na espécie de *Candida parapsilosis* a CIM foi de 256 µg/mL a qual coincidiu com a CFM em 100% das cepas ensaiadas. Com relação ao ensaio de associação, utilizou-se a cepa ATCC 13803 e outra clínica - LM-34 de *C. tropicalis*. Os resultados mostraram antagonismo das substâncias analisadas tanto para cepa ATCC 22019, quanto para cepa clínica LM-34. O estudo da micromorfologia demonstrou inibição das estruturas de virulência como pseudo-hiifas e blastoconídeos nas três concentrações analisadas (CIM; CIMx2 e CIMx4), em ambas as cepas avaliadas de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. A curva de morte microbiana mostrou um efeito fungicida após 24 horas de experimento em ambas as espécies estudadas. Os resultados do presente estudo indicam uma forte atividade da molécula do eugenol sobre as cepas de *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* analisadas, podendo representar uma alternativa terapêutica para o tratamento da candidíase oral.

**Palavras-chave:** Fitoterapia; Candidíase Bucal; Eugenol

## ABSTRACT

The *Candida* genus usually has a commensal relationship in the oral cavity, modifying factors may alter this relationship directly or indirectly, making it pathogenic, triggering oral candidiasis. The phytotherapeutic products have been constituting a therapeutic alternative, widely used in the treatment of candidiasis. The objective of this study was to isolate and identify strains of *Candida tropicalis* and *Candida parapsilosis* from the oral cavity of healthy individuals through macro and micromorphology, physiological and biochemical tests. The *in vitro* and *in silico* sensitivity of these strains to eugenol and nystatin was then evaluated by determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC); Minimal Fungicide Concentration (MFC) and analyzing the mechanisms of action through microbial growth kinetics, micromorphology and association study (*checkboard*), and *in silico* assay. Eight strains of *Candida tropicalis*, one from the American Type Culture Collection - ATCC 13803 and seven from clinical origin and seven from *Candida parapsilosis* to their ATCC standard (22019) and six from clinical isolates were used. An antifungal activity of eugenol on the tested species was observed, a MIC and MFC of 64 µg / mL for *Candida tropicalis* was determined. The CFM / MIC ratio indicates fungicidal activity compared to 87.5% of the tested strains. In the *Candida parapsilosis* species the MIC was 256 µg / mL which coincided with the CFM in 100% of the strains tested. Regarding the association assay, strain ATCC 13803 and another clinic - LM-34 of *C. tropicalis* were used, the results showed antagonism of the substances analyzed for both the ATCC 22019 strain and the LM-34 clinical strain. Micromorphology demonstrated inhibition of virulence structures such as pseudohyphae and blastoconideas at the three concentrations analyzed for *C. tropicalis* (ATCC 13803 and LM-34) and *C. parapsilosis* (ATCC 22019 and LM-70) strains. The microbial death curve showed a fungicidal effect after 24 hours of experiment in both species studied. The results of the present study indicate a strong activity of the eugenol molecule on the strains of *Candida tropicalis* and *Candida parapsilosis* analyzed and could represent a therapeutic alternative for the treatment of oral candidiasis.

**Keywords:** Phytotherapy; Candidiasis Oral; Eugenol

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ASD** - Ágar Sabouraud Dextrose

**ATCC** - American Type Culture Collection

**CIM** - Concentração Inibitória Mínima

**CFM** - Concentração Fungicida Mínima

**CSD** - Caldo Sabouraud Dextrose

**ICIF**: Índice de Concentração Inibitória Fracionada

**LM** - Laboratório de Micologia

**SIDA** - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

**TCLE** - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**UFC** - Unidades formadoras de colônias

**UFC/mL** - Unidades formadoras de colônias por mililitro

## LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO 1

**Figura 1:** Fotomicrografia de microscopia óptica (aumento 400x) das estruturas de virulência na ausência ou presença do eugenol. **A:** Controle de crescimento *Candida tropicalis* (LM-34); **A1:** Atividade do fitoconstituente eugenol na concentração de 128 µg/mL **A2:** Atividade do eugenol na concentração de 64 µg/mL. **B:** Controle de crescimento *Candida tropicalis* ATCC 13803; **B1:** Crescimento de estruturas na concentração de 256 µg/mL; **B2:** Presença de raras estruturas na concentração de 128 µg/mL.....14

**Figura 2:** Curva de tempo-morte microbiana para o efeito antifúngico do Eugenol (A) Nistatina (B) para a cepa clínica LM-34; (C) Eugenol; (D) Nistatina para a cepa ATCC 13803, nas concentrações CIM, CIMX2, CIMX4 nos tempos 0, 2, 4, 8, 12, 24h.....17

### CAPÍTULO 2

**Figura 1:** A- Crescimento das colônias em meio sólido Ágar Sabouraud Dextrose após 48 horas da realização do esfregaço; B - Crescimento de colônias de *Candida parapsilosis* em CHROMOagar-*Candida*.....29

**Figura 2:** Micromorfologia em microscopia óptica (aumento 400X) na ausência (controle) e presença do eugenol. (A) *C. parapsilosis* ATCC 22019 na ausência do produto, demonstrando estruturas como blastoconídeos e pseudo-hifas. (B) *C. parapsilosis* ATCC 22019 na presença do fitoconstituente, observa-se poucas leveduras e pseudo-hifas. (C) *C. parapsilosis* LM-70 na ausência do eugenol exibindo grande quantidade de estruturas celulares, blastoconídeos e pseudo-hifas. (D) *C. parapsilosis* LM-70 sob ação da CIM do eugenol, poucas estruturas celulares.....32

**Figura 3:** Curva de tempo-morte microbiana para o efeito antifúngico do Eugenol (A) Cepa ATCC 22019 (B) a cepa clínica LM-70; nas concentrações CIM, CIMX2, CIMX4 nos tempos 0, 2, 4, 8, 12, 24h. ....32

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

**Tabela 1:** Prevalência de espécies de *Candida* provenientes da cavidade bucal dos indivíduos .....13

**Tabela 2:** Resultados da determinação da CIM e CFM do eugenol e nistatina sobre *C. tropicalis*..... 14

**Tabela 3:** Análise qualitativa da micromorfologia da cepa ATCC 13803 e cepa clínica LM-34 na presença do eugenol e nistatina e ausência (controle) das estruturas .....14

**Tabela 4:** Estudo de associação (checkboard) do Eugenol *Candida tropicalis* ATCC 13803 (CIM<sub>sol.</sub>: 128 µg/mL CIM<sub>comb.</sub>:512µg/mL) e Nistatina (CIM<sub>sol.</sub>: 16 µg/mL CIM<sub>comb.</sub>:64µg/mL); Eugenol *Candida tropicalis* LM-34 (CIM<sub>sol.</sub>: 64 µg/mL CIM<sub>comb.</sub>: 128µg/mL) e Nistatina (CIM<sub>sol.</sub>: 8µg/mL CIM<sub>comb.</sub>: 32µg/mL).....16

### CAPÍTULO 2

**Tabela 1:** Resultados do *screening* dos produtos para avaliação da resposta antifúngica.....30

**Tabela 2:** Resultados da avaliação da CIM e CFM do eugenol e nistatina sobre *C. parapsilosis* CIM\*(Eugenol)100%:64µg/mL .....31

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. CAPÍTULO 1: ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO de <i>Candida tropicalis</i> ENVOLVIDAS EM INFECÇÕES FÚNGICAS E SENSIBILIDADE <i>IN VITRO</i> FRENTE AO EUGENOL</b> .....	5
2.1 Introdução .....	6
2.2 Metodologia .....	7
2.4 Resultados .....	12
2.4 Discussão .....	17
2.5 Conclusão .....	20
Referências .....	20
<b>3. CAPÍTULO 2: EFEITO ANTIFÚNGICO DO EUGENOL SOBRE CEPAS DE <i>Candida parapsilosis</i> ISOLADAS DA CAVIDADE BUCAL DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS</b> .....	23
3.1 Introdução .....	24
3.2 Metodologia .....	25
3.3 Resultados .....	29
3.4 Discussão .....	33
3.5 Conclusão .....	35
Referências .....	35
<b>4. CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	38
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	40
<b>REFERÊNCIAS*</b> .....	41
<b>ANEXO 1 – CERTIDÃO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA</b> .....	45
<b>ANEXO 2 – INSTRUÇÕES AOS AUTORES PARA SUBMISSÃO NO PERIÓDICO JOURNAL OF APPLIED ORAL SCIENCE</b> .....	46
<b>ANEXO 3 – INSTRUÇÕES AOS AUTORES PARA SUBMISSÃO NO PERIÓDICO MYCOPATHOLOGIA</b> .....	49
<b>APÊNDICE 1 – CARTA DE ANUÊNCIA</b> .....	50
<b>APÊNDICE 2- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</b> .....	52
<b>Apêndice 3 – Formulário –A Formulário de auto avaliação da saúde bucal adaptado de Pinheiro et al., 2005</b> .....	54
<b>APÊNDICE 4: EXAME MICOLÓGICO</b> .....	56

## 1. INTRODUÇÃO

A cavidade bucal possui uma microbiota residente bastante diversificada, entre as espécies que habitam o ambiente oral, encontra-se a do gênero *Candida*, que normalmente vivem em equilíbrio dinâmico no ambiente oral.<sup>3,26</sup>

No entanto, quando há um quadro de desarmonia nessa relação ou alterações na imunidade do hospedeiro, as espécies de *Candida* costumam ter comportamento diferente daquele nas relações comensais, tornando-se patogênicas, o que gera um quadro de instabilidade na saúde do hospedeiro.<sup>16</sup>

*Candida* é considerado como um fungo leveduriforme, diplóide e polimorfo e são encontrados em cerca de 60% dos dentados saudáveis. O desenvolvimento do processo infeccioso pode ocorrer tanto em tecidos superficiais (mucosas), como em tecidos profundos, podendo levar a morte do indivíduo.<sup>32</sup>

A candidíase oral é uma infecção fúngica mais prevalente nos tecidos bucais, desencadeada pelo micro-organismo fúngico do gênero *Candida*, que compreende cerca de 200 espécies, porém apenas 15 destes são de interesse clínico. Na candidíase oral, a espécie com maior frequência no aparecimento da patologia é a *Candida albicans*<sup>23</sup>. Clinicamente, ela pode ser caracterizada pelo aparecimento de placas brancas ou máculas avermelhadas de forma isolada ou agrupada aderida ao longo dos tecidos bucais - mucosa jugal, palato, língua e gengiva<sup>29</sup>.

É possível evidenciar variados quadros em que ocorre a manifestação da candidíase, por exemplo, em pacientes infectados com HIV (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)<sup>2</sup>. A candidíase oral aparece como um dos principais sinais mais comum na cavidade oral dos indivíduos soro positivo, sendo muitas vezes uma característica que leva ao diagnóstico inicial.<sup>31</sup> É comum também, observar casos de candidíase oral em pacientes usuários de próteses, sendo apresentada na forma estomatite protética, onde as cepas desse micro-organismo tem papel fundamental no desenrolar da patologia.<sup>31</sup>

Ainda é possível constatar casos de candidíase em indivíduos portadores de *diabetes mellitus*, alteração de caráter sistêmico, que, quando não controlada pode predispor a inúmeras alterações bucais, inclusive, a candidíase<sup>28</sup>. Em

portadores de Síndrome de Down, além das alterações ocasionadas pela síndrome, ainda é possível evidenciar uma maior susceptibilidade desse grupo frente ao desenvolvimento da candidíase.<sup>22</sup> Por fim, alterações que afetam o sistema imunológico do hospedeiro, como radioterapia, quimioterapia, antibioticoterapia, tornam o indivíduo mais vulneráveis a processos infecciosos, incluindo os fúngicos.<sup>13</sup>

A maioria das espécies presentes nos casos de candidíase é representada por *Candida albicans*, porém vários estudos têm demonstrado uma contribuição significativa de outras espécies não-albicans: *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* e *Candida dubliniensis*.<sup>20</sup> *Candida tropicalis* é a espécie mais encontrada, logo após da *C. albicans*, em casos de candidíase oral.<sup>12</sup> Pesquisas mostram que cepas de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* são encontradas em casos graves da candidíase bucal ou de resistência.<sup>14</sup>

*Candida parapsilosis* é um micro-organismo ubíquo e diferentemente das outras espécies de *Candida*, não é um patógeno humano obrigatório, ocorrendo relatos de isolamento de sítios que não são provenientes do corpo humano.<sup>34</sup> Além disso, pode ser considerada importante no desencadeamento da candidíase bucal, pois está envolvida em casos de resistência bucal, como também é considerada a segunda espécie de fungos oportunistas isoladas de culturas sanguíneas de várias localidades geográficas.<sup>33,34</sup>

O processo de estabelecimento da doença é determinado por fatores inerentes ao hospedeiro associados aos dos fungos. As características de virulência fúngica são responsáveis pela colonização e consolidação do processo infeccioso. Destaca-se como fatores de virulência: dimorfismo (transição da fase leveduriformes para a forma filamentosa), produção de enzimas (fosfolipases e proteinases), capacidade de se adaptar as variações de temperatura, pH, e formação de biofilmes.

O tratamento da infecção fúngica procede-se com medicamentos locais ou sistêmicos ou associação desses.<sup>35</sup> Normalmente a candidíase é tratada com aplicações de agentes tópicos como a nistatina na forma de suspensão (polienos) ou miconazol gel (imidazóis). Em episódios recorrentes, institui-se uma terapia medicamentosa sistêmica, sendo o fluconazol a droga eleita para prescrição por suas características farmacológicas potentes contra o processo de resistência<sup>21,35</sup>

Os agentes poliênicos são compostos anfipáticos que formam uma rede molecular com o ergosterol, parte fundamental para a membrana citoplasmática fúngica, ocasionando a formação de poros na membrana. Esse processo desencadeia um desequilíbrio nas concentrações de componentes celulares, incluindo proteínas e cátions monovalentes e divalentes, afetando o processo dinâmico osmótico da célula fúngica, levando a perda da polaridade da membrana o que ocasiona a morte celular.<sup>9,19</sup>

O miconazol é um derivado dos imidazóis e seu mecanismo de ação ocorre por meio da interferência da biossíntese do ergosterol, principal derivado esteroide presente na membrana celular das leveduras. O mecanismo ocorre pela inibição da 14- $\alpha$ -desmetilase enzima do citocromo P450, que catalisa a reação de oxidação do grupo 14- $\alpha$ -metil do lanosterol. Isso acarreta uma interrupção da síntese de ergosterol e acúmulo de lanosterol, causando interferência no arranjo estrutural dos grupamentos lipídeos presentes na membrana. Esse processo compromete vias enzimáticas ligadas a estrutura celular fúngica, inibindo o crescimento e o crescimento fúngico.<sup>3</sup>

No entanto, de acordo com os achados na literatura, é possível constatar fatores relacionados à resistência, efeitos tóxicos e colaterais dos agentes antifúngicos envolvidos no tratamento da candidíase, o que desperta o interesse em pesquisar por novos produtos que maximize a eficácia do tratamento e minimize os riscos para os pacientes.<sup>12</sup>

A fitoterapia tem constituído uma terapêutica alternativa no tratamento das afecções orais, por exemplo, a candidíase oral<sup>5</sup>. Souza; Felfili<sup>30</sup> (2006) afirmam a importância dos produtos naturais na odontologia, justamente por ter um grande espectro de utilização popular, baixo custo e adequados efeitos antimicrobianos e quando utilizados na dosagem certa tem a vantagem de não apresentarem efeitos colaterais.

No Brasil, a fitoterapia, desde 2006, está inserida no Sistema Único de Saúde como parte das Práticas Integrativas e Complementares, que tem como objetivo incentivar a utilização de plantas medicinais como forma de tratamento das doenças que acometem o corpo<sup>8</sup>. Souza; Felfili<sup>30</sup> salientam ainda, que o Brasil possui uma vasta biodiversidade, o que reflete na grande variabilidade de plantas que possui efeitos fitoterápicos significativos.

Os produtos naturais, em especial os óleos essenciais, têm mostrado resultados positivos *in vitro/in vivo* em relação ao efeito antifúngico, geralmente a propriedade antifúngica está diretamente ligada a um composto bioativo majoritário do óleo essencial, denominado fitoconstituente.<sup>17</sup>

O eugenol (2-metoxi-4-(2-propenil) fenol) é um composto, presente nos óleos essenciais do *Mentha pulegium* (poejo), *Myristica fragans* (noz-mascada), *Ocotea odorífera* (sassafrás), *Cinnamomum zeylanicum blume* (canela) e no *Eugenia caryophyllata* (cravo da índia), esse último apresenta cerca de 70% de eugenol em sua composição.<sup>1,7,11</sup>

Quimicamente o eugenol é classificado como um terpenóide, da classe dos monoterpenos, seus efeitos são relatados pela medicina popular e cientificamente alguns efeitos biológicos já são comprovados, como: analgésicos, anti-inflamatório, antitumoral, antioxidante, anestésico.<sup>15,17</sup> Tais efeitos justificam o fato de já ser um composto amplamente utilizado na clínica odontológica associada a outras substâncias.<sup>27</sup>

Analisando sua conformação molecular, supõe-se que, do ponto de vista biofísico, essa molécula pode ter um comportamento anfipático e/ou hidrofóbico. A partir dessas informações, sugere-se que o eugenol pode afetar a organização da membrana celular e o equilíbrio eletrostático, conseqüentemente agindo sobre a atividade de proteínas intrínsecas, tais como ATPases e receptores específicos da membrana.<sup>25</sup>

Ahmad et al.<sup>1</sup> (2010), em suas pesquisas, avaliaram, a atividade da H<sup>+</sup> ATPase e associaram com o pH intracelular de *Candida* na presença de eugenol e timol. Observou-se que o efeito dos compostos foi eficaz, sugerindo que os dois fenóis interagiram diretamente com a enzima, a qual funcionou como alvo específico na célula para ação do agente antifúngico, uma vez que as cepas ensaiadas mostraram aumento da acidificação interna, o que resultou em uma diminuição do pH intracelular, prejudicando a viabilidade celular fúngica.

Porém, os estudos ainda são escassos sobre o modo de ação antifúngico do eugenol e sua associação com antifúngicos contra cepas clínicas de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. Dessa forma, o presente estudo analisou a atividade antifúngica do eugenol frente a cepas de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* isoladas da cavidade bucal de indivíduos saudáveis.

## **2. CAPÍTULO 1: ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO de *Candida tropicalis* ENVOLVIDAS EM INFECÇÕES FÚNGICAS E SENSIBILIDADE *IN VITRO* FRENTE AO EUGENOL**

O manuscrito a seguir foi submetido para publicação no periódico “Journal of Applied Oral Science” ISSN: 1678-7765 / Qualis Capes Odontologia: A2 e encontra-se em análise – Normas para publicação Anexo 2

José Klidenberg de Oliveira Júnior\*: Mestrando em Ciências Odontológicas do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal da Paraíba, João-Pessoa, Paraíba, Brazil. E-mail: joseklidemberg@gmail.com.

Daniele de Figueredo Silva: Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João-Pessoa, Paraíba, Brazil. E-mail: danielufigueredo31@gmail.com.

Julliana Cariry Palhano: Doutoranda em Clínicas Odontológicas, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, Paraíba, Brazil, E-mail: jullianapalhano@hotmail.com

Janiere Pereira de Sousa: Doutora em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba João-Pessoa, Paraíba, Brazil. E-mail: janiereps@yahoo.com.br.

Felipe Queiroga Sarmiento Guerra: Doutor, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil, e-mail: felipeqsguerra@gmail.com.

Ana Luíza Alves de Lima Perez: Mestre em Ciências Odontológicas pela Universidade Federal da Paraíba, João-Pessoa, Paraíba, Brazil, e-mail: analuiza\_perez@yahoo.com.br.

Edeltrudes de Oliveira Lima: Doutora, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil, e-mail: edeolima@yahoo.com.br.

### **Autor correspondente\***

José Klidenberg de Oliveira Júnior, Rua Sebastião Avelino da Rocha, Jardim São Paulo, Ed. Corais do Sul, Bloco B, Apto: 303B CEP: 58053-150. Contato: +55(83) 99929-4773; e-mail: joseklidemberg@gmail.com.

**RESUMO:** Neste estudo, realizou-se o isolamento e identificação das espécies clínicas de *Candida tropicalis* da cavidade bucal de indivíduos saudáveis, posteriormente foi avaliada a sensibilidade destas cepas frente o eugenol e nistatina. Para tanto, realizou-se a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM); Concentração Fungicida Mínima (CFM), assim como a cinética de crescimento microbiano, micromorfologia e estudo de associação (*checkboard*). Selecionaram-se oito cepas de *Candida tropicalis* no total, sete de isolados clínicos, e uma padrão da American Type Culture Collection (ATCC 13803). A atividade antifúngica do eugenol sobre as espécies ensaiadas, foi observada em 90% e 65%, das cepas sensíveis, respectivamente, a uma CIM de 64 µg/mL e CFM de 64 µg/mL. A relação CFM/CIM indica atividade fungicida frente a 87,5% das cepas testadas. Com relação ao ensaio de associação, utilizou-se a cepa de *C. tropicalis* ATCC 13803 e outra cepa clínica LM-34, os resultados mostraram antagonismo das substâncias analisadas tanto para cepa ATCC quanto para cepa clínica. O estudo da micromorfologia demonstrou inibição das estruturas de virulência como pseudo-hiifas e blastoconídeos nas três concentrações analisadas. A curva de morte microbiana mostrou um efeito fungicida após 24 horas de experimento em ambas as espécies estudadas. Dessa forma, o eugenol apresentou um efeito antifúngico satisfatório sobre o grupo de leveduras analisadas, podendo ser um agente antifúngico no tratamento de candidíase oral.

Palavras-chave: Candidíase. Fitoterapia. Eugenol.

## 2.1 Introdução

*Candida* é um fungo leveduriforme, diplóide e polimorfo que vive em relação de comensalismo com o hospedeiro e podem ser encontrados em cerca de 60% dos dentados saudáveis<sup>1</sup>. Fatores modificadores podem alterar essa relação de forma direta ou indiretamente, tornando-o patogênico<sup>2,3</sup>.

Entre as infecções fúngicas mais prevalentes em mucosas, encontra-se a candidíase oral, patologia caracterizada pelo aparecimento de placas brancas ou máculas avermelhadas de forma isolada ou agrupada aderida ao longo dos tecidos bucais - mucosa jugal, palato, língua e gengiva<sup>4</sup>.

A maioria das espécies presentes nos casos de candidíase é causada por *Candida albicans*, porém vários estudos têm demonstrado uma contribuição significativa de outras espécies não-*albicans*: *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* e *Candida dubliniensis*<sup>5</sup>. *Candida tropicalis* é a espécie mais encontrada, logo após da *C. albicans*, em casos de candidíase bucal<sup>6</sup>. Pesquisas mostram que cepas

de *C. tropicalis* são encontradas em casos avançados da candidíase bucal ou resistência<sup>7</sup>.

Na atualidade os antifúngicos licenciados não têm mostrado eficácia clínica no combate da candidíase, causando resistência ou episódios de recorrência da patologia fúngica<sup>8</sup>. Os produtos naturais, em especial os óleos essenciais, vem demonstrando resultados positivos em estudos *in vitro/in vivo* em relação ao efeito antifúngico, geralmente a propriedade antifúngica desses compostos está diretamente ligada a um composto majoritário do óleo essencial, denominado fitoconstituente<sup>9</sup>.

Nesse contexto, o eugenol ((2-metoxi-4-(2-propenil) fenol)) é um composto, presente nos óleos essenciais da *Mentha pulegium* (poejo), *Myristica fragrans* (noz-mascada), *Ocotea odorífera* (sassafrás), *Cinnamomum zeylanicum blume* (canela) e na *Eugenia caryophyllata* (cravo), esse último apresenta cerca de 70% de eugenol em sua composição<sup>10</sup>. Quimicamente o eugenol é classificado como um terpenóide, da classe dos monoterpenos, seus efeitos são relatados pela medicina popular e cientificamente alguns efeitos biológicos já são comprovados, como: analgésicos, anti-inflamatório, antitumoral, antioxidante, anestésico<sup>12,13</sup>. Tais efeitos justifica o fato de já ser um composto amplamente utilizado na clínica odontológica associada a outras substâncias<sup>14</sup>.

O presente estudo isolou e identificou espécies clínicas de *Candida tropicalis* da cavidade bucal de indivíduos saudáveis, posteriormente foi avaliada a sensibilidade destas cepas frente o eugenol e antifúngico padrão nistatina a partir da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM); Concentração Fungicida Mínima (CFM) e analisando os mecanismos de ação por meio da cinética de crescimento microbiano, micromorfologia e estudo de associação (*checkboard*).

## 2.2 Metodologia

### **Tipo de estudo**

A identificação das leveduras e as análises referentes ao estudo da atividade antifúngica dos produtos naturais selecionados foram realizadas no Laboratório de Pesquisa da Atividade Antibacteriana e Antifúngica de produtos naturais e/ou sintéticos bioativos, DCF/CCS/UFPB.

O presente estudo foi submetido e aprovado (CAAE: 5743516.4.0000.5188) pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba (CEP-CCS), de acordo com a resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/MS.

## **Coleta, Isolamento e Identificação do gênero *Candida***

A coleta do material biológico, bem como o isolamento e identificação das espécies de *Candida* foram realizados seguindo os critérios estabelecidos por Looder<sup>15</sup> (1970); Hoog e Garro<sup>16</sup> (1995); Kurtzmann e Fell<sup>17</sup> (1998); Sidrim e Rocha<sup>18</sup> (2004).

Na coleta do material biológico para isolamento e identificação de espécies de *Candida* dos indivíduos foram utilizados três swabs (INLAB® Confiança, Brasil) estéris. Cada swab foi umedecido em solução fisiológica esterilizada e aplicado em três sítios distintos da cavidade buca do paciente: palato duro, língua e mucosa jugal com movimentos de varredura (fricção), por 30 segundos, em cada sítio anatômico. O material biológico coletado foi inoculado em placas de Petri descartáveis 15x90 mm (Dispopetri), contendo Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) (Difco Laboratories Ltda. USA/France), adicionado de cloranfenicol a 100 µg/mL (Sigma Chemical Corporation, St Louis, MO, USA). Decorrido o período de 24-48h em estufa microbiológica a 35±2°C as colônias crescidas e com aspectos de fungos leveduriformes foram isoladas em CHROMOagar-*Candida* (Difco Laboratories Ltda. USA/France) e após a verificação do crescimento nas placas as colônias foram avaliadas quanto à coloração e ao morfotipo. Ainda para a determinação das espécies de *Candida* realizou-se os seguintes testes: prova do tubo germinativo, microcultivo de leveduras em Ágar Fubá, auxanograma (assimilação de carboidratos e nitrogênio) e fermentação de carboidratos.

## **Seleção das cepas fúngicas e preparação do inóculo**

Os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, sendo adultos, com idade igual ou superior a 18 anos, de ambos os sexos, não utilizar nenhum tipo de prótese dentária e depois de realizado o exame clínico intraoral não apresentar nenhuma alteração bucal, como por exemplo, a candidíase oral.

Foram isoladas e identificadas sete cepas clínicas de *C.tropicalis* da cavidade bucal dos indivíduos participantes (LM-2; LM-34; LM-77; LM-82; LM-96; LM-100; LM-211) para os ensaios *in vitro* adicionou-se ainda uma cepa padrão da coleção American Type Culture Collection (ATCC)13803.

Para o procedimento de preparação do inóculo das leveduras, os isolados foram cultivados em meio ASD inclinado a 35±2°C por 24h (overnight). Foram preparadas suspensões dos microrganismos em tubos contendo 5 mL de solução salina 0,9% estéril (Farmax - Distribuidor Ltd., Amaral, Divinópolis, MG, Brasil).

Após agitação em vortex (Fanem Ltd., Guarulhos, SP, Brasil), cada suspensão teve sua turbidez comparada e ajustada àquela apresentada pela suspensão de sulfato de bário do tubo 0,5 da escala McFarland. Em seguida, essa suspensão foi diluída com água destilada numa proporção de 1:10 resultando em um inóculo contendo aproximadamente  $10^5$  UFC/mL, que foi utilizado nos ensaios<sup>19,25</sup>.

### **Meios de cultura utilizados**

Para os ensaios de atividade antifúngica foi utilizado RPMI 1640/ com L-glutamina sem bicarbonato (Sigma-Aldrich®/Stenheim/Alemanha) e Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) com antibiótico – ASD e ASDA (Difco®/USA/France). Os meios foram preparados de acordo com as instruções do fabricante.

### **Produtos utilizados**

Os produtos testes utilizados foram o fitoconstituente eugenol (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil®; Lote: 024) e o antifúngico padrão Nistatina (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil®; Lote: SLBB5282V)

Todos os produtos utilizados foram devidamente solubilizados em dimetil-sulfóxido (DMSO) numa proporção de até 10 % e Tween 80 a 0,02%. Em seguida, foi completado com água destilada esterilizada (q.s.p. 3 mL) para obter uma emulsão na concentração inicial de 1024 µg/mL.

### **Ensaio biológico**

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

A determinação da CIM do produto selecionado foi realizada pela técnica de microdiluição, executada em triplicata, utilizando microplacas com fundo em “U”, esterilizadas, contendo 96 orifícios (Kasvi, Itália)<sup>20,21,22,23,24,25</sup>.

Em cada poços da placa, foram adicionados 100 µL do meio líquido RPMI 1,6x4,0 (Sigma-Aldrich®/São Paulo, SP/Brasil) duplamente concentrado. Posteriormente, 100 µL dos produtos (eugenol e nistatina), também duplamente concentrados, foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa, que foram diluídos seriadamente, a partir da retirada de uma alíquota de 100 µL da cavidade mais concentrada para a cavidade sucessora, obtendo-se concentrações de 1024 µg/mL até 2 µg/ML<sup>25</sup>.

Por fim, foram adicionados 10 µL do inóculo das leveduras nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se a uma cepa fúngica, especificamente.

Foram feitos controles de viabilidade das cepas fúngicas e do meio de cultura líquido RPMI 1640 nas mesmas condições do ensaio. As placas foram seladas e incubadas a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 24-48h. Utilizou-se como critérios para determinação da CIM os seguintes valores: 50 a 500 µg/mL considerados com forte/ótima atividade antimicrobiana; 600 a 1500 µg/mL possuem atividade moderada; acima de 1500 µg/mL, atividade fraca ou produto inativo<sup>26,27</sup>.

Após determinação da CIM, alíquotas 10 µL do sobrenadante das cavidades correspondentes à concentração inibitória mínima e as duas concentrações superiores a concentração inibitória mínima (CIM, CIMx2 e CIMx4) foram subcultivadas em placas de microdiluição com fundo em "U", esterilizadas, com 96 orifícios (Kasvi, Itália) contendo 100 µL RPMI 1640 (Sigma-Aldrich®/Stenheim/Alemanha) e incubadas por 24-48h a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

O crescimento microbiano foi verificado visualmente com base nos controles e determinada a CFM para cada cepa. Os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado expresso pela moda das CFM's obtidas nos três ensaios<sup>20</sup>.

A relação CFM/CIM foi calculada de forma a determinar se a substância possui uma atividade fungistática (CFM/CIM  $\geq 4$ ) ou fungicida (CFM/CIM  $< 4$ )<sup>28</sup>.

### **Efeito dos produtos teste isolados sobre a micromorfologia de *C. tropicalis***

Para o estudo de possíveis alterações na micromorfologia de *C. tropicalis* foi empregada à técnica de microcultivo em lâmina em placa de Petri (câmara úmida)<sup>29</sup>. O meio de cultura ágar-fubá-Tween 80 fundido foi fracionado em tubos estéreis contendo os produtos testes isolados em concentração correspondente a CIM. Também foi utilizado um tubo apenas com o meio de cultura (controle negativo). Após homogeneização, cada meio de cultura foi espalhado sobre uma lâmina de vidro.

Repiques de 24 horas a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  em ágar Sabouraud dextrose de *C. tropicalis* foram semeados e as placas foram incubadas a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 24 - 48h. As lâminas foram analisadas por microscopia óptica, em um aumento de 400x, para observação da formação ou não de estruturas características como blastoconídios, pseudo-hifas e clamidoconídios.

## **Efeito dos produtos teste isolados sobre a cinética de morte microbiana**

O estudo da interferência do produto teste isolado sobre a curva de tempo de morte das cepas fúngicas foi realizado utilizando a metodologia de Klepser *et al*<sup>30</sup> (1998), com algumas modificações.

Foram utilizadas duas cepas de *C. tropicalis*, uma padrão da ATCC 13803 e outra cepa clínica (LM-82). Neste ensaio, frente às concentrações inibitórias mínimas do eugenol e nistatina foi observado o comportamento das cepas de leveduras selecionadas ao longo de 24h.

Inicialmente, 100 µL RPMI 1640 (Sigma-Aldrich®/São Paulo-SP/Brasil) foram adicionados em uma microplaca com fundo em “U” com 96 orifícios utilizando 10 µL do sobrenadante das cavidades correspondente à concentração inibitória e as duas concentrações superiores a CIM (CIM, CIMx2 e CIMx4) e incubadas por um período 24-48 horas a 35±2°C.

Em seguida o plaqueamento do inóculo foi realizado em Placa Petri (Alamar Tecno Científica LTDA®) contendo o meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose (Difco®), e uma alíquota de 10 µL do inóculo foi retirado com uma alça bacteriológica calibrada (INLAB Confiança, Brasil) e posteriormente semeado de forma uniforme em formato de estrias ao longo da superfície do meio ASD, durante os intervalos de tempo 0 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h e 24 h. As placas inoculadas foram incubadas a 35±2°C por 48 horas.

O experimento foi realizado em triplicata. As curvas foram construídas plotando a contagem média de colônias ( $\log_{10}$ UFC/mL) em função do tempo (horas). Foi considerada atividade fungicida da droga quando houve redução no crescimento maior ou igual a 3  $\log_{10}$  ( $\geq 99,9\%$ ) a partir do inóculo inicial, e atividade fungistática quando houve redução no crescimento menor que 3  $\log_{10}$  ( $< 99,9\%$ ) UFC/ mL)<sup>30</sup>.

## **Ensaio de sinergismo pelo método *checkerboard***

O efeito de associação dos produtos com antifúngico padrão será determinado a partir da técnica de microdiluição – *checkerboard* para derivação do ICIF (Índice da Concentração Inibitória Fracionada).

Serão utilizadas soluções dos produtos testados em concentrações determinadas a partir de suas respectivas CIM. Inicialmente, 100 µL de caldo Saboraud dextrose serão adicionados nos poços da microplaca estéril contendo 96 cavidades, com fundo em forma de “U” (ALAMAR®). Em seguida, 50 µL de cada produto testado, em diversas concentrações (CIM÷16, CIM÷8, CIM÷4, CIM÷2, CIM, CIMx2, CIMx4, CIMx8 e CIMx16)

serão adicionados no sentido vertical (antifúngico padrão) e horizontal (produtos teste) da microplaca. Por fim, será adicionado 10 µL da suspensão fúngica. O ensaio será realizado em duplicata, sendo as microplacas incubadas a 35 °C por 48 horas.<sup>31,32</sup>

O ICIF (Índice da Concentração Inibitória Fracionada) será calculado através da soma do  $CIF^A + CIF^B$ , onde A representa o produto teste e B o antifúngico padrão. O  $CIF^A$ , por sua vez, é calculado através da relação  $CIM^A$  combinado/ $CIM^A$  sozinho, enquanto que o  $CIF^B = CIM^B$  combinado/ $CIM^B$  sozinho. Este índice é interpretado da seguinte forma: sinergismo ( $ICIF \leq 0,5$ ), antagonismo ( $ICIF > 4,0$ ) e indiferença ( $0,5 < ICIF \leq 4$ ).<sup>32</sup>

### **Análise dos dados**

Os dados da CIM, CFM e do Ensaio da Associação foram analisados por meio da estatística inferencial e descritiva. A curva de cinética de crescimento microbiana foi plotada pelo log<sub>10</sub>UFC/mL em função do tempo e das concentrações estudadas, sendo assim para esse experimento, a análise estatística se deu pelos testes de Kruskal-Wallis e Dunn considerando um nível de significância de 0.05 ( $p < 0,05$ ). Foi utilizado o Software GrafPad (GraphPad for Windows, San Diego, CA – USA) para gerar os resultados da presente pesquisa.

### **2.3 Resultados**

Participaram da pesquisa 20 indivíduos, com maior prevalência para o sexo feminino (60%) e idade média de 50,6 anos. Na tabela abaixo é possível evidenciar a quantidade e identificação de espécies provenientes do isolamento da cavidade bucal dos indivíduos participantes na pesquisa (Tabela 1).

Tabela 1: Prevalência de espécies de *Candida* provenientes da cavidade bucal dos indivíduos n: número da amostra; *fi*: frequência total.

Sítio anatômico Espécie	Palato		Mucosa jugal		Língua		
	n	<i>fi</i>	n	<i>fi</i>	n	<i>fi</i>	
<i>Candida albicans</i>	4	10,3	7	17,9	9	23,1	
<i>Candida tropicalis</i>	4	7,7	-	-	3	10,3	
<i>Candida parapsilosis</i>	2	5,1	1	2,6	3	7,6	
<i>Candida krusei</i>	2	5,1	1	2,6	3	7,7	
<b>Total</b>	<b>11</b>	<b>28,2</b>	<b>9</b>	<b>23,1</b>	<b>18</b>	<b>48,7</b>	<b>100</b>

A avaliação do efeito antifúngico do eugenol e da nistatina sobre *C. tropicalis* foi realizado através da determinação CIM e CFM pela técnica de microdiluição em caldo. A CIM do eugenol foi de 64  $\mu\text{g/mL}$  inibindo 90% das cepas utilizadas no experimento. Na nistatina apresentou uma CIM inferior ao do fitoconstituente 8  $\mu\text{g/mL}$  para 90% das espécies testadas.

O teste da CFM, para o eugenol, apresentou concentrações inibitórias em 75% das cepas analisadas, semelhantes ao do teste da CIM, caracterizando o produto de natureza fungicida. Para nistatina, em quatro cepas testadas (ATCC 13803; LM-2; LM-77; LM 82) (50%) tiveram a CFM semelhante com as concentrações da CIM, enquanto outras quatro espécies apresentaram CFM superior ao valor da CIM (LM-34; LM-96; LM-100 e LM-32).

O controle de esterilidade do meio não apresentou contaminação, todos os poços no controle de crescimento fúngico foram positivos. Os dados estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Resultados da avaliação da CIM e CFM do eugenol e nistatina sobre *C. tropicalis*. CIM<sup>A</sup>(Eugenol)<sub>90%</sub>:64µg/mL CIM<sup>B</sup>(NISTATINA)<sub>87,5%</sub>:8µg/mL

Cepas <i>C.tropicalis</i>	Eugenol (µg/mL)				Nistatina (µg/mL)			
	CIM <sup>A</sup>	CFM	CFM /CIM ≥ 4	Atividade antifúngica	CIM <sup>B</sup>	CFM	CFM/ CIM	Atividade antifúngica
ATCC 13803	128	512	≥ 4	Fungistático	16	16	1	Fungicida
LM-2	32	32	1	Fungicida	8	8	1	Fungicida
LM-34	64	64	1	Fungicida	8	16	2	Fungicida
LM-77	64	64	1	Fungicida	8	8	1	Fungicida
LM-82	64	64	1	Fungicida	8	8	1	Fungicida
LM-96	64	64	1	Fungicida	8	16	2	Fungicida
LM-100	32	32	1	Fungicida	8	16	2	Fungicida
LM-211	64	64	1	Fungicida	8	32	8	Fungistático

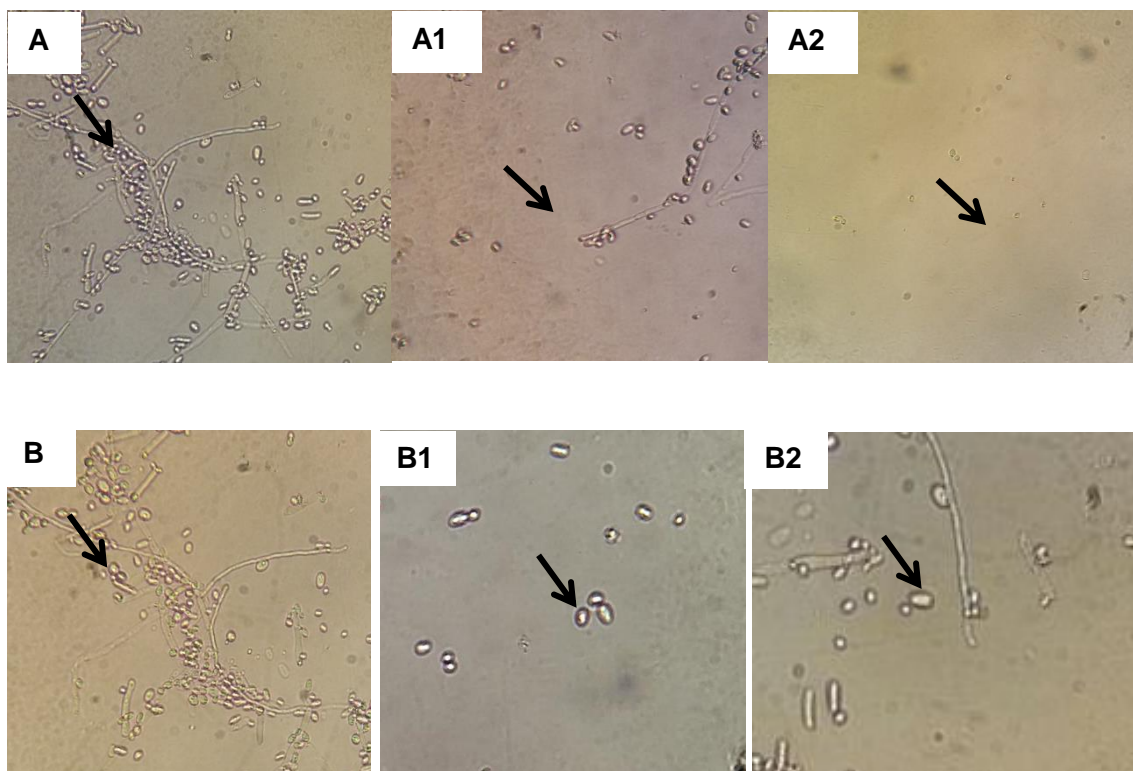
Realizou-se o estudo micromorfológico com o objetivo de avaliar o crescimento e/ou inibição das estruturas de virulência na presença ou ausência dos produtos testados. Para esse experimento, escolheu-se de forma aleatória uma cepa clínica - LM-34, dentro daquelas com a CIM mais prevalente (64µg/mL) das cepas testadas e a padrão ATCC 13803 de *C. tropicalis*. Os dados estão descritos na Tabela 3 e Figura 1.

<i>Candida tropicalis</i>		Estruturas de virulência		
		Pseudo-hifas	Blastoconídeos	Clamidoconídeos
Eugenol				
ATCC 13803	CONTROLE	+	+	+
	CIM	-	+	-
	CIMX2	-	*	-
	CIMX4	-	*	-
LM-34	CONTROLE	+	+	+
	CIM	-	*	-
	CIMX2	-	-	-
	CIMX4	-	-	-

#### Nistatina

ATCC 13803	CONTROLE	+	+	+
	CIM	-	+	-
	CIMX2	-	*	-
	CIMX4	-	-	-
LM-34	CONTROLE	+	+	+
	CIM	-	-	-
	CIMX2	-	-	-
	CIMX4	-	-	-

**Tabela 3:** Análise qualitativa da micromorfologia da cepa ATCC 13803 e cepa clínica LM-34 na presença do eugenol e nistatina e ausência ( controle) das estruturas . + Crescimento das estruturas; -: ausência das estruturas; \*: raras estruturas



**Figura 1:** Fotomicrografia de microscopia óptica (aumento 400x) das estruturas de virulência na ausência ou presença do eugenol. **A:** Controle de crescimento *Candida tropicalis* (LM-34); **A1:** Atividade do fitoconstituente eugenol na concentração de 128  $\mu\text{g/mL}$  **A2:** Atividade do eugenol na concentração de 64  $\mu\text{g/mL}$ . **B:** Controle de crescimento *Candida tropicalis* ATCC 13803; **B1:** Crescimento de estruturas na concentração de 256  $\mu\text{g/mL}$ ; **B2:** Presença de raras estruturas na concentração de 128  $\mu\text{g/mL}$

O estudo da associação foi realizado pela técnica do checkboard o qual possibilita a construção de uma matriz bidimensional através da combinação das diferentes concentrações das substâncias avaliadas. De acordo com os resultados obtidos, o teste foi igual a 8 (oito) para a cepa padrão ATCC 13803 e 6 (seis) para a cepa LM-34, observando uma relação de antagonismo (ICIF > 4,0) da nistatina com o eugenol, esse valor foi obtido através da fórmula álgebra fornecida pelo Índice de Concentração Inibitória (ICIF), que considera a CIMs isoladas e combinadas dos produtos resultando no valor do índice (Tabela 4).

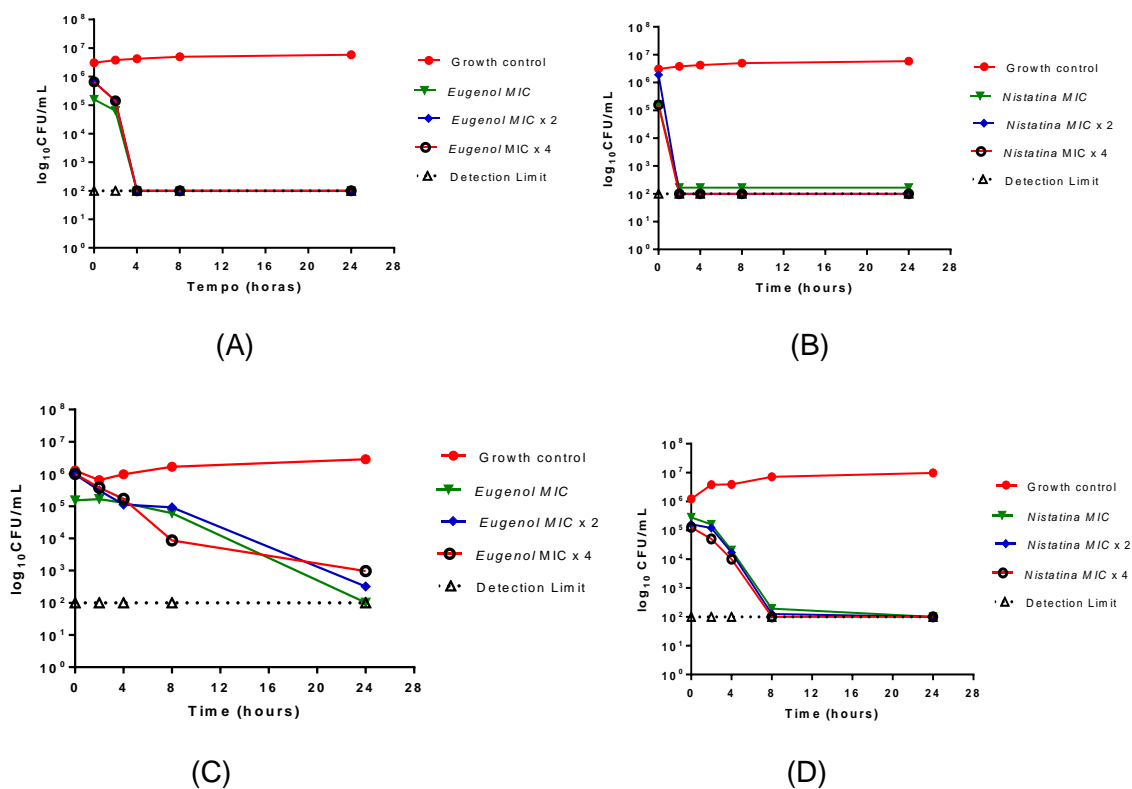
Cepas fúngicas	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )			Índice ICIF	Tipo de interação
	Eugenol	Nistatina	Eugenol - Nistatina		
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	128	16	512-64	8	Antagônica
<i>C. tropicalis</i> LM- 34	64	8	128-32	6	Antagônica

**Tabela 4:** Estudo de associação (*checkboard*) do Eugenol frente *Candida tropicalis* ATCC 13803 (CIM<sub>isol.</sub>: 128  $\mu\text{g/mL}$  CIM<sub>comb.</sub>: 512 $\mu\text{g/mL}$ ) e Nistatina (CIM<sub>isol.</sub>: 16  $\mu\text{g/mL}$  CIM<sub>comb.</sub>: 64 $\mu\text{g/mL}$ ); Eugenol frente *Candida tropicalis* LM-34 (CIM<sub>isol.</sub>: 64  $\mu\text{g/mL}$  CIM<sub>comb.</sub>: 128 $\mu\text{g/mL}$ ) e Nistatina (CIM<sub>isol.</sub>: 8 $\mu\text{g/mL}$  CIM<sub>comb.</sub>: 32 $\mu\text{g/mL}$ ).

Analisou-se através da curva de morte microbiana, se ocorreu redução significativa do crescimento fúngico em relação à quantidade de Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/mL) nas concentrações estudadas da nistatina e eugenol - CIM, CIMX2, CIMX4, quando comparados ao grupo do controle de crescimento.

Os dados estão expressos na Figura (2A, 2B, 2C, 2D). Na cepa clínica LM-34 observou-se um decréscimo considerável na curva de morte microbiana a partir do tempo de 8h para todas as concentrações estudadas. A nistatina (B), para a mesma cepa, apresentou uma diminuição da curva após 4h em todas as concentrações testadas. Foi possível observar um potencial efeito do eugenol sobre o crescimento de *C. tropicalis* a partir do tempo de exposição correspondente a 2 e 4 horas. Em ambas as cepas avaliadas constatou-se ausência total de crescimento fúngico no tempo de 24h tanto para o antifúngico padrão quanto para o fitoconstituente estudado.

**Figura 2:** Curva de tempo-morte microbiana para o efeito antifúngico do Eugenol (A) Nistatina (B) para a cepa clínica LM-34; (C) eugenol; (D) nistatina para a cepa ATCC 13803, nas concentrações CIM, CIMX2, CIMX4 nos tempos 0, 2, 4, 8, 12, 24h.



### 2.3 Discussão

O presente estudo constatou uma prevalência de 48,3% de espécies não-*albicans*, em destaque a *Candida tropicalis* que apresentou uma frequência de 18% entre as espécies isoladas, demonstrando uma distribuição representativa ao longo dos sítios avaliados. Esses dados corroboram aos do de Mushi et al (2016)<sup>33</sup>, o qual apresentou a *C. tropicalis* como a segunda espécie mais frequente em isolados da cavidade oral de indivíduos saudáveis e HIV- positivos.

Resultados semelhantes foram mostrados por Rajakumari e Kumari<sup>34</sup> (2016), nesse estudo foi avaliado a presença de cepas *albicans* e não-*albicans* em uma amostra de 400 indivíduos, divididos em 50% portadores de *diabetes mellitus* e a outra metade em não diabéticos, os resultados apontaram um maior aparecimento de *Candida albicans* seguido de *C. tropicalis* tanto em diabéticos (39,61%; 19%) como em saudáveis (9,53%; 29%) respectivamente.

Com relação à atividade antifúngica do eugenol, a Concentração Inibitória Mínima ficou estabelecida 64µg/mL (CIM 90%). De acordo com os parâmetros estabelecidos por Holetz (2002) e Sartoratto (2004)<sup>26,27</sup> para avaliação da CIM do produto, o fitoconstituente avaliado apresentou um forte/ótima atividade antimicrobiana (CIM 50 a 500 µg/ mL-atividade ótima). Ressalva-se o fato de que o produto-teste obteve uma CIM bem próxima a da nistatina, antifúngico padrão utilizado na clínica odontológica para tratamento da candidíase.

Resultados semelhantes foram encontrados por Marcos-Aires et al<sup>35</sup> (2011) que realizaram a avaliação da sensibilidade de cepas de *Candida* isoladas da superfície da prótese dentária frente a dez fitoconstituíntes, dentre eles, o eugenol, como resultado a molécula demonstrou atividade inibitória sobre todas as cepas ensaiadas.

Braga, et al<sup>36</sup>. (2007) determinaram uma concentração de 500µg/ mL sobre biofilmes de *Candida albicans* utilizando o eugenol como produto teste e ainda observaram-se alterações morfológicas nas estruturas fúngicas. Sugere-se então que futuros estudos poderiam subsidiar a formação de biofilmes de uni/multiespécies e possíveis efeitos e mecanismos de ação sobre estruturas celulares fúngicas consideradas alvos para detecção de substâncias antifúngicas.

A CFM teve valores semelhantes ao da CIM em 90% das cepas, de acordo com avaliação de Saddiq e Khayyat<sup>37</sup> (2010) a substância possui uma atividade fungistática quando a relação CFM/CIM  $\geq 4$  e fungicida quando CFM/CIM  $<4$ , já Hafidh,<sup>38</sup> et al. (2011) considera a relação 1:1 e 2:1, o produto é considerado fungicida e fungistático com a razão maior que 2:1. Seguindo os parâmetros metodológicos das avaliações acima, o eugenol tem caráter fungicida para as cepas avaliadas. O efeito fungicida do eugenol já foi constatado também nos estudos de Fontanelle<sup>39</sup> et al (2011) o qual obteve uma atividade fungicida através da relação CIM/CFM para o grupo de leveduras analisadas (*C. albicans*, *tropicalis*, *parapsilosis* e *krusei*).

O estudo micromorfológico indicou a inibição de estruturas como pseudo-hifas e clamidoconídeos, essas estruturas são consideradas como fatores de virulências desenvolvidos por *Candida spp* com a finalidade de se estabelecer, colonizar e causar a doença<sup>40</sup>. Substâncias que cessem o crescimento dessas estruturas contribuirão para o insucesso do processo infeccioso, por isso são consideradas as estruturas alvo dos agentes terapêuticos<sup>36</sup>.

No presente estudo a ausência dessas estruturas foram diretamente proporcionais às concentrações insatisfatórias do eugenol analisadas. Na literatura nota-se uma escassez de estudos que relatem alterações micromorfológicas de *Candida tropicalis* na presença do eugenol. Achados parecidos foram relatados por Freire<sup>41</sup> et al (2017), que

observou uma diminuição drástica nas estruturas de virulência na presença de citral, alterando a morfologia das cepas *albicans*.

A associação entre o antifúngico padrão com o produto estudado resultou em uma atividade antifúngica antagônica, ou seja, a união dos dois compostos não potencializou o efeito sobre as leveduras estudadas e sim, uma redução desta atividade. Possivelmente a relação farmacodinâmica de antagonismo é do tipo químico, na qual as substâncias desenvolveram uma ligação química com o agonista reduzindo sua eficácia. Na literatura não existem estudos relatando os efeitos da associação entre o eugenol com polienos sobre *Candida tropicalis*.

A ausência do sinergismo entre nistatina e eugenol não inviabiliza o desenvolvimento de outros ensaios que busquem avaliar o perfil desse fitoconstituente em associação para com outros antifúngicos. Ahmad <sup>42</sup> et al (2010) analisou o efeito da associação entre o eugenol, metileugenol associados individualmente com o fluconazol, como resultado foi encontrado um alto efeito sinérgico entre os compostos analisados e o fluconazol sobre cepas de *Candida albicans*, *tropicalis* e *parapsilosis*. Nessa perspectiva, sugere-se que em estudos futuros, sejam realizados ensaios de associação do eugenol com outros antifúngicos e de classes distintas, objetivando avaliar os possíveis efeitos dessa combinação de forma integral.

O crescimento fúngico foi analisado baseado na curva de morte microbiana através das diferentes concentrações do eugenol e nistatina estudadas (Figura 2). Esse experimento avalia através da contagem de colônias se o produto tem ação fungicida ou fungistática sobre as cepas analisadas, dessa forma, através deste teste é possível estabelecer uma relação dinâmica entre concentração e atividade inibitória ao longo dos tempos analisados. A cepa clínica de *C. tropicalis* LM-34 em oito horas de experimento teve uma redução de 2 log<sub>10</sub>UFC/mL, em 24 horas a curva baixou para 3 log<sub>10</sub>UFC/mL nas três concentrações analisadas. A cepa ATCC 13803 obteve um decréscimo de 3 log<sub>10</sub>UFC/mL em quatro horas de teste nas concentrações correspondentes a CIM e CIM x2, demonstrando seu potencial efeito antifúngico sobre a espécie de *C. tropicalis*.

Considerando os critérios de avaliação estabelecidos por Klesper<sup>30</sup>, et al. (1998) que classifica o produto em fungicida quando existe uma diminuição na contagem de células viáveis em 3 log<sub>10</sub> UFC/mL, pode-se afirmar que no presente estudo o eugenol teve ação fungicida coincidindo com o resultado do teste da CFM. Não houve crescimento visível nas 24 horas em ambas às cepas testadas quando expostas as três concentrações. Tal comportamento expressa uma dependência do tempo para ação da substância atingir seu efeito fungicida.

O eugenol em concentração fungicida causa uma redução significativa de estruturas como ergosterol presente na membrana plasmática da célula fúngica agindo principalmente na interferência da síntese da enzima H<sup>+</sup> ATPase consequentemente provocando o colapso da célula fúngica, tendo em vista que a função dessa enzima é a regulação fisiológica da viabilidade <sup>1,34,40,42</sup>.

## 2.4 Conclusão

Os resultados desse estudo permitem concluir que *Candida tropicalis* foi à espécie com a segunda maior prevalência nos isolados clínicos. O eugenol teve ação fungicida sobre as leveduras de *Candida tropicalis* testadas, e revelou possui valores de inibição semelhantes ao da nistatina. As concentrações do fitoconstituente inibem o crescimento e causam a morte da espécie fúngica em função do tempo de ação. Em adicional, o estudo da micromorfologia inibiu estruturas de virulências importantes no processo infeccioso para consolidação da candidíase bucal e ainda foi possível constatar uma atividade farmacológica indiferente do eugenol quando associado à nistatina no ensaio de associação.

Dessa forma, o eugenol é um agente antifúngico promissor para tratamentos de infecções fúngicas da cavidade bucal, sugere-se que em estudos futuros a investigação concentre-se nos mecanismos de ação sobre a célula fúngica bem como observar o seu perfil citotóxico frente a células humanas.

## Referências

1. Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. *Arch Oral Biol.* 2006; 51:672-80.
2. Musthafa KS, Hmoteh J, Thamjarungwong B, Voravuthikunchai SP. Antifungal potential of eugenyl acetate against clinical isolates of *Candida* species. *Microb Pathog.* 2016; 99:19-29.
3. Neville BW, Damm DD, Allen CC, Bouquot, JE. *Patologia Oral Maxilo-Facial.* Rio Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
4. Santos JDD, Piva E, Vilela SFG, Jorge AOC, Junqueira JC. Mixed biofilms formed by *C. albicans* and non-*albicans* species: a study of microbial interactions. *Braz Oral Res.* 2016;301-8.
5. Menezes, EA, Cavalcante MDS, Farias RB, Teixeira AB, Pinheiro FG, Bezerra BP, Torres, JCN, Cunha FA. Frequency and enzymatic activity of *Candida albicans* isolated from the buccal mucosa of children of a day-care center of the city hall of Fortaleza, Ceará, Brazil. *J.Bras.Patol.Med.Lab.* 2005;4:9-13.
6. Crocco EI, Mimica LM, Muramatu LH, Garcia C, Souza VM, Ruiz LR, Zaitz C. Identification of *Candida* species and antifungal susceptibility in vitro: a study on 100 patients with. *An Bras Dermatol.* 2004; 79:689-697.

7. Gableri IG, Barbosa AC, Velela RR, Lyon S, Rosa, CA. Incidence and anatomic localization of oral candidiasis in patients with AIDS hospitalized in a public hospital in Belo Horizonte, MG, Brazil. 2008. *J Appl Oral Sci.* 2008;16:247-250.
8. Fontenelle RO, Morais SM, Brito EH, Brilhante RS, Cordeiro RA, Lima YC, Brasil NVGPS, Monteiro AJ, Sidrim JJC, Rocha MF. Alkylphenol activity against *Candida* spp. and *Microsporum canis*: a focus on the antifungal activity of thymol, eugenol and O-methyl derivatives. *Molecules.* 2011;16:622-643.
9. He M, Du M, Fan M, Bian Z. In vitro activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia.* 2007; 163:137-143.
10. Daniel AN, Sartoretto SM, Schmidt G, Caparroz-Assef SM, Bersani-Amado CA, Cuman RKN. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of eugenol essential oil in experimental animal models. *Braz J Pharm.* 2009; 19:212-217.
11. Manikandan P, Senthil RM, Priyadarsini RV, Vinothini G, Nagini S. Eugenol induces apoptosis and inhibits invasion and angiogenesis in a rat model of gastric carcinogenesis induced by MNNG. *Life Sci.* 2010; 86:936–941.
12. Guenette SA, Beaudry F, Marier JF, Vachon P. Pharmacokinetics and anesthetic activity of eugenol in male Sprague–Dawley rats. *J Vet Pharmacol Ther.* 2006; 29: 265–270.
13. Hidalgo ME, De la Rosa C, Carrasco H, Cardona W, Gallardo C, Espinoza L. Antioxidant capacity of eugenol derivatives. *Quim Nova.* 2009; 32: 1467-1470
14. Rached-Junior FJA, Sousa-Neto MD, Souza-Gabriel AE, Duarte MAH, Silva-Sousa Y. TC. Impact of remaining zinc oxide-eugenol–based sealer on the bond strength of a resinous sealer to dentine after root canal retreatment. *Int Endo J.* 2014; 47:463-469.
15. Lodder I. *The Yeast: a Taxonomic study.* Amsterdam: Horth Helland Publishing; 1970.
16. Hoog GS, Guarro J. *Atlas of clinical fungi.* Central bureau voorschimm el cultures. Virgii: Universitat Rovira; 1995.
17. Kurtzmann CP, Fell JW. *The yeast: a taxonomic study.* 4. ed. New York: Elsevier; 1998.
18. Sidrim JJC, Rocha MFG. *Micologia Médica à luz de autores contemporâneos.* Rio de Janeiro: Ed. Guanabara; 2004.
19. Borsato DM, Esmerino LA, Farago PV, Miguel MD, Miguel OG. Atividade antimicrobiana de méis produzidos por meliponíneos nativos do Paraná (Brasil). *Bol. Cent. Pesq. Proces. Alim.* 2013; 31:57-66.
20. Espinel-Ingroff A, Chaturvedi V, Fothergill A, Rinaldi MG. Optimal testing conditions for determining MICs and minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for uncommon molds: NCCLS collaborative study. *J Clin Microbiol.* 2002; 40:3776-3781.
21. Cleeland R, Squires E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections. In: Lorian VMD. *Antibiotics in Laboratory Medicine.* Williams & Wilkins. 1991; 1991:739-788.
22. Ellof JN. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Med.* 1998; 64:711-713.
23. Hadacek F, Greger H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochem Anal.* 2000; 11:137-147.
24. Konemam EW, Winn WC, Allen SD, Janda WM, Procop GW, Scherckenberger PC. et al. *Diagnóstico microbiológico.* 5 ed. Rio de Janeiro: MEDS; 2001: 551-588.
25. Clinical and Laboratory Standards Institute: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. 3 edition. CLSI, Wayne, PA, USA; 2010, CLSI document M27-A3 and Supplement S3.

26. Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Dias-Filho BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. Mem. Instit Oswaldo Cruz, 2002; 97:1027-1031.
27. Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. Braz J Microbiol. 2004; 35:275-280.
28. Siddiqui ZN, Farooq F, Musthafa TNM, Ahmad A, Khan AU. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. J Saudi Chem Society 2013; 17: 237-243. .
29. Dalmau LM. Remarques sur la technique mycologique. Ann Parasitol Hum Com. 1929. 7: 536-545.
30. Klepser ME, Ernst EJ, Lewis RE, Ernst ME, Pfaller MA (1998) Influence of test conditions on antifungal timekill curve results: Proposal for standardized methods. Antimicrobial Agents Chemother. 42:1207–1212.
31. Eliopoulos, G.M.; Moellering, R.C. 1991. Antimicrobial combinations. In: Lorian, V. (ed): Antibiotics in Laboratory Medicine. Baltimore, MD.
32. Odds, FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. J. Antimicrob. Chemother. 2003. 52:1
33. Mushi, MF, Mtemisika, CI, Bader, O, Bii, C, Mirambo, MM, Groß U, & Mshana, SE. High Oral Carriage of Non-albicans Candida spp. among HIV-infected individuals. Inter. J. I. Dis. 2016. 49:185-188.
34. Rajakumari ML, Kumari PS.. Prevalence of Candida species in the buccal cavity of diabetic and non-diabetic individuals in and around Pondicherry. J. Med. Mycol. 2016; 26:359-367.
35. Marcos-Arias C, Eraso E, Madariaga L, Quindós, G. In vitro activities of natural products against oral Candida isolates from denture wearers. BMC Compl. Altern. Med. 2011; 111-119.
36. Braga PC, Dal Sasso M, Culici M, Alfieri M. (2007). Eugenol and thymol, alone or in combination, induce morphological alterations in the envelope of Candida albicans. Fitot. 2007; 78:396-400.
37. Saddiq AA, Khayyat SA. Chemical and antimicrobial studies of monoterpene: Citral. Pesticide Biochem and Physiol. 2010; 98:89-93.
38. Hafidh RR, Abdulmir AS, Vern LS, Bakar FA, Abas F, Jahanshiri F, et al. Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. Open Microbiol J. 2011; 5:96–106.
39. Fontenelle RO, Morais SM, Brito EH, Brilhante RS, Cordeiro RA, Lima, YC, Rocha MF. Alkylphenol activity against Candida spp. and Microsporum canis: a focus on the antifungal activity of thymol, eugenol and O-methyl derivatives. Mol. 2011;16: 6422-6431.
40. De Rossi T, Lozovoy MAB, Silva RV, Fernandes EV, Geraldino TH, Costa IC, Felipe I. Interações entre Candida albicans e hospedeiro. Semina, 2011; 32: 15-28.
41. Freire JCP, Oliveira-Júnior JKO, Silva DDF, Sousa JPD, Guerra FQS, Lima EO Antifungal Activity of Essential Oils against Candida albicans Strains Isolated from Users of Dental Prostheses. Evid-Bas. Compl. and Altern. Med. 2017; 2017:1-10
42. Ahmad A, Khan A, Khan LA, Manzoor N. In vitro synergy of eugenol and methyleugenol with fluconazole against clinical Candida isolates. J Med Microbiol.2010; 59: 1178-1184.

### **3. CAPÍTULO 2: EFEITO ANTIFÚNGICO DO EUGENOL SOBRE CEPAS DE *Candida parapsilosis* ISOLADAS DA CAVIDADE BUCAL DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS**

O manuscrito a seguir foi submetido para publicação no periódico “Mycopathologia” ISSN: 1573-0832 Qualis Capes B1 e encontra-se em análise Normas para publicação Anexo 3.

#### **EFEITO ANTIFÚNGICO DO EUGENOL SOBRE CEPAS DE *Candida parapsilosis* ISOLADAS DA CAVIDADE BUCAL DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS**

José Klidemberg de Oliveira Júnior\*: Mestrando em Ciências Odontológicas do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal da Paraíba, João-Pessoa, Paraíba, Brazil. E-mail: joseklidemberg@gmail.com.

Daniele de Figueredo Silva: Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária, s/n – Castelo Branco III, João-Pessoa, Paraíba, Brazil. CEP: 58051-085 E-mail: danielefigueredo31@gmail.com.

Julliana Cariry Palhano: Doutoranda em Clínicas Odontológicas, Universidade Estadual da Paraíba, Rua Baraúnas, 351, Universitário Campina Grande. Paraíba, Brazil, CEP:58429-500, E-mail: jullianapalhano@hotmail.com

Janiere Pereira de Sousa: Doutora em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária,s/n – Castelo Branco III, João-Pessoa, Paraíba, Brazil. CEP: 58051-085. E-mail: janiereps@yahoo.com.br.

Edeltrudes de Oliveira Lima: Doutora, Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária, s/n – Castelo Branco III, João Pessoa, Paraíba, Brazil, CEP: 58051-085 e-mail: edeolima@yahoo.com.br.

#### **Autor correspondente\***

José Klidemberg de Oliveira Júnior, Rua Sebastião Avelino da Rocha, Jardim São Paulo, Ed. Corais do Sul, Bloco B, Apto: 303B CEP: 58053-150, João Pessoa, Paraíba, Brazil. Contato: +55(83) 99929-4773; e-mail: [joseklidemberg@gmail.com](mailto:joseklidemberg@gmail.com). ORCID: 0000-0002-4539-2007.

**Resumo:** Objetivou-se isolar e identificar espécies clínicas de *Candida parapsilosis* da cavidade bucal de indivíduos saudáveis, como por exemplo, a candidíase bucal. Em seguida foi avaliada a sensibilidade destas cepas frente o eugenol e nistatina. Para tal, foi realizada a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM); Concentração Fungicida Mínima (CFM) a curva de morte de crescimento microbiano e inibição de fatores de virulência através da micromorfologia. Selecionou-se sete cepas, seis de origem clínica de *Candida parapsilosis* e a sua padrão ATCC (22019). A CIM ficou determinada em 256 µg/mL a qual coincidiu com a CFM em 100% das cepas ensaiadas. O estudo da micromorfologia demonstrou inibição das estruturas de virulência como pseudo-hiifas e blastoconídeos nas três concentrações analisadas. A curva de morte microbiana mostrou um efeito fungicida após 24 horas de experimento nas cepas estudadas. Dessa forma, o eugenol constitui uma molécula promissora no tratamento das infecções fúngicas orais.

**Descritores:** Eugenol. Fitoterapia. Infecções Fúngicas. Candidíase.

### 3.1 Introdução

A candidíase bucal é uma infecção fúngica mais prevalente na cavidade bucal, desencadeada pelo micro-organismo fúngico do gênero *Candida*, que compreende cerca de 200 espécies, porém apenas 15 são de interesse clínico. Na candidíase bucal, a espécie mais prevalente no aparecimento da patologia é a *Candida albicans* [1]. Todavia estudos tem demonstrado uma prevalência significativa de espécies *não albicans* no desenvolvimento do processo patogênico e em casos de resistência, em especial de *Candida parapsilosis* [2]:

*Candida parapsilosis* é um micro-organismo ubíquo e diferentemente das outras espécies de *Candida*, não é um patógeno humano obrigatório, ocorrendo relatos de isolamento de sítios que não provenientes do corpo humano [3,4]. Além disso, pode ser considerada importante no desencadeamento da candidíase bucal e é considerada a segunda espécie de fungos oportunistas isoladas de culturas sanguíneas de várias localidades geográficas [5].

É possível evidenciar a manifestação da candidíase bucal, em quadros de alteração sistêmica como na infecção por Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), diabetes mellitus, síndrome de Down e terapias que suprimem a resposta do hospedeiro como a radioterapia, quimioterapia, antibioticoterapia, os tornam mais vulneráveis a processos infecciosos, incluindo os fúngicos, onde já se sabe que as espécies do gênero *Candida* são predominantes, além de quadros de infecção local como em pacientes usuários de prótese [6,7,8].

O tratamento da infecção fúngica procede-se com medicamentos locais ou sistêmicos ou associação desses [9]. Normalmente a candidíase é tratada com aplicações de agentes tópicos como a nistatina na forma de suspensão (políenos) ou miconazol gel (imidazóis), em episódios recorrentes, institui-se uma terapia medicamentosa sistêmica, nesse caso o fluconazol é a droga eleita para prescrição<sup>9</sup>. No entanto é possível constatar fatores relacionados à resistência, efeitos tóxicos e colaterais dos agentes antifúngicos envolvidos

no tratamento da candidíase, surgindo à necessidade em pesquisas maximize a eficácia do tratamento e minimize os riscos para os pacientes [10,11].

Dessa forma, a fitoterapia tem constituído uma terapêutica alternativa no tratamento da candidíase oral [11]. O eugenol é uma molécula presente em diversas espécies de plantas [12]. Estudos mostram como sendo um dos constituintes majoritários quando extraídos das partes das plantas como folhas, frutos e caule [13]. Seu uso na odontologia já é consolidado para tratamento de alterações pulpares como também para procedimentos restauradores dos dentes [14]. Suas propriedades relatadas na literatura são analgésicas, antimicrobianas, anestésicas, antioxidante, anti-inflamatória e antisséptica [15,16]. Porém na literatura não existe estudos sobre o modo de ação antifúngico e sua associação com antifúngicos licenciados contra cepas clínicas de *C. parapsilosis*.

O presente estudo isolou e identificou espécies clínicas de *Candida parapsilosis* da cavidade bucal de indivíduos sistematicamente saudáveis, posteriormente foi avaliada a sensibilidade destas cepas frente o eugenol e antifúngico licenciado padrão nistatina a partir da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM); Concentração Fungicida Mínima (CFM) e analisando os mecanismos de ação por meio da cinética de crescimento microbiano e inibição de fatores de virulência através da micromorfologia.

### **3.2 Metodologia**

#### ***Desenho do estudo***

A coleta do material biológico foi realizada na Comunidade Recanto do Poço, Cabedelo – PB, Brasil. A identificação das leveduras e as análises referentes ao estudo da atividade antifúngica dos produtos naturais selecionados foram realizadas no Laboratório de Pesquisa da Atividade Antibacteriana e Antifúngica de produtos naturais e/ou sintéticos bioativos, DCF/CCS/UFPB.

O estudo experimental foi dividido em duas etapas. A primeira é a *ex vivo* com a coleta do material biológico da cavidade bucal dos indivíduos e posteriormente o isolamento e identificação das cepas de *Candida parapsilosis*, a segunda etapa foi realização dos ensaios *in vitro*. O presente estudo foi submetido e aprovado (CAAE: CAAE: 57435016.4.0000.5188) pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba (CEP-CCS), de acordo com a resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/MS.

#### ***Coleta, Isolamento e Identificação do gênero Candida***

A coleta do material biológico, bem como o isolamento e identificação das espécies de *Candida* foram realizados seguindo os critérios estabelecidos por Looder [17]; Hoog e Garro [18]; Kurtzmann e Fell [19]; Sidrim e Rocha [20].

Na coleta do material biológico para isolamento e identificação de espécies de *Candida* dos indivíduos foi utilizado três swabs (INLAB® Confiança, Brasil) estéreis. Cada swab foi umedecido em solução fisiológica esterilizada e aplicado em três sítios distintos da cavidade bucal: palato duro, língua e

mucosa jugal, do paciente com movimentos de varredura, por 30 segundos, em cada sítio anatômico. O material biológico coletado foi inoculado em placas de Petri descartáveis 15x90 mm (Dispopetri), contendo Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) (Difco Laboratories Ltda. USA/France), adicionado de cloranfenicol a 100 µg/mL (Sigma Chemical Corporation, St Louis, MO, USA). Decorrido o período de 24-48h em estufa microbiológica a 35±2°C as colônias crescidas e com aspectos de fungos leveduriformes foram isoladas em CHROMOagar-*Candida* (Difco Laboratories Ltda. USA/France) e após a verificação do crescimento nas placas as colônias foram avaliadas quanto à coloração e ao morfotipo. Após esta avaliação, a identificação presuntiva foi realizada.

Ainda para a determinação das espécies de *Candida* realizou-se os seguintes testes: prova do tubo germinativo, microcultivo de leveduras em Ágar Fubá, auxanograma (assimilação de carboidratos e nitrogênio) e fermentação de carboidratos.

### ***Seleção das cepas fúngicas e preparação do inóculo***

Participaram da pesquisa 20 indivíduos de acordo com os critérios de inclusão estabelecidos na pesquisa: idade igual ou superior a 18 anos, de ambos os sexos, não utilizasse nenhum tipo de prótese dentária e após a avaliação clínica intraoral não possuir nenhuma alteração bucal.

Foram isoladas e identificadas seis cepas clínicas de *C.parapsilosis* da cavidade bucal dos indivíduos participantes (LM-1; LM-2; LM-7; LM-70; LM-225; LM-302) para os ensaios *in vitro* adicionou-se ainda uma cepa padrão da de *C. parapsilosis* coleção American Type Culture Collection (ATCC) 22019.

Para o procedimento de preparação do inóculo das leveduras, os isolados foram cultivados em meio ASD inclinado a 35±2°C por 24h (overnight). Foram preparadas suspensões dos micro-organismos em tubos contendo 5 mL de solução salina 0,9% estéril (Farmax - Distribuidor Ltda., Amaral, Divinópolis, MG, Brasil). Em seguida, essas suspensões foram agitadas por 2 minutos com auxílio do aparelho Vortex (Fanem Ltd., Guarulhos, SP, Brasil). Após agitação, cada suspensão teve sua turbidez comparada e ajustada àquela apresentada pela suspensão de sulfato de bário do tubo 0,5 da escala McFarland, a qual corresponde a um inóculo de aproximadamente 10<sup>6</sup>UFC/mL. Em seguida, essa suspensão foi diluída com água destilada numa proporção de 1:10 resultando em um inóculo contendo aproximadamente 10<sup>5</sup> UFC/mL, que foi utilizado nos ensaios [21].

### ***Meios de cultura utilizados***

Para os ensaios de atividade antifúngica foi utilizado RPMI 1640/ com L-glutamina sem bicarbonato (Sigma-Aldrich®/Stenheim/Alemanha) e Ágar Sabouraud com antibiótico – ASD e ASDA (Difco®/USA/France). Os meios foram preparados de acordo com as instruções do fabricante.

### ***Produtos utilizados***

Os produtos testes utilizados foram o fitoconstituente eugenol (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil®; Lote: 024) *Mentha Piperita L.* (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil®; Lote: 55791mv) *Eugenia Uniflora* (0717/05209/F Quinare®) *Eugenia Uniflora* (55791mv Sigma Aldrich®) e o antifúngico padrão Nistatina (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil®; Lote: SLBB5282V)

Todos os produtos utilizados foram devidamente solubilizados em dimetil-sulfóxido (DMSO) numa proporção de até 10 % e Tween 80 a 0,02%. Em seguida, foi completado com água destilada esterilizada (q.s.p. 3 mL) para obter uma emulsão na concentração inicial de 1024 µg/mL.

### ***Ensaio biológicos***

#### ***Screening, determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Fungicida Mínima (CFM)***

O *screening* dos produtos naturais e a determinação da CIM do produto selecionado foram realizados pela técnica de microdiluição, executada em triplicata, utilizando microplacas com fundo em “U”, esterilizadas, contendo 96 orifícios (Kasvi, Itália) [22, 23, 24, 25, 26, 27]. Em cada orifício da placa, foram dispensados 100 µL do meio líquido RPMI 1640 (Sigma-Aldrich®/São Paulo, SP/Brasil) duplamente concentrado. Posteriormente, 100 µL dos produtos, também duplamente concentrados, foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa, que foram diluídos seriadamente, a partir da retirada de uma alíquota de 100 µL da cavidade mais concentrada para a cavidade sucessora, obtendo-se concentrações de 1024µg/mL até 32µg/mL para o *screening* e de 1024µg/mL até 2µg/mL para a determinação da CIM, de modo que na primeira linha da placa encontra-se a maior concentração e na última, a menor concentração. Por fim, foram adicionados 10µL do inóculo das leveduras nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se a uma cepa fúngica, especificamente. Foram feitos controles de viabilidade das cepas fúngicas e do meio líquido de cultura nas mesmas condições do ensaio. As placas foram seladas e incubadas a 35±2°C por 24-48h. Define-se a CIM para os produtos usados nos ensaios biológicos como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento fúngico verificado nos orifícios, quando comparado com o crescimento controle.

Utilizou-se como critérios para determinação da CIM os seguintes valores: 50 a 500 µg/mL considerados com forte/ótima atividade antimicrobiana; 600 a 1500 µg/mL possuem atividade moderada; acima de 1500 µg/mL, atividade fraca ou produto inativo [29].

Após determinação da CIM, alíquotas 10 µL do sobrenadante das cavidades correspondentes à concentração inibitória e as duas concentrações imediatamente mais concentradas (CIM, CIMx2 e CIMx4) foram subcultivadas em placas de microdiluição com fundo em “U”, esterilizadas, com 96 orifícios (Kasvi, Itália) contendo 100 µL RPMI 1640 (Sigma-Aldrich®/Stenheim/Alemanha) e incubadas por 24-48h a 35±2°C.

O crescimento microbiano foi verificado visualmente com base nos controles e determinada a CFM para cada cepa. Os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado expresso pela moda das CFM's obtidas nos três ensaios [20].

A relação CFM/CIM foi calculada de forma a determinar se a substância possui uma atividade fungistática ( $CFM/CIM \geq 4$ ) ou fungicida ( $CFM/CIM < 4$ ) [30].

#### ***Efeito dos produtos teste isolados sobre a micromorfologia de *C. parapsilosis****

Para o estudo de possíveis alterações na micromorfologia de *C. parapsilosis* foi empregada à técnica de microcultivo em lâmina em placa de Petri (câmara úmida) [31]. O meio de cultura ágar-fubá-Tween 80 fundido foi fracionados em tubos estéreis contendo os produtos testes isolados em concentração correspondente a CIM. Também foi utilizado um tubo apenas com o RPMI (Controle). Após homogeneização, cada meio de cultura foi espalhado sobre uma lâmina de vidro.

Repiques de 24 horas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  em ágar Sabouraud dextrose de *C. parapsilosis* foram semeados e as placas foram incubadas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 24 - 48h. As lâminas foram analisadas por microscopia óptica, em um aumento de 400x, para observação da formação ou não de estruturas características como blastoconídios, pseudo-hifas e clamidoconídios.

#### ***Efeito dos produtos teste isolados sobre a cinética de morte microbiana***

O estudo da interferência do produto teste isolado sobre a curva de tempo de morte das cepas fúngicas foi realizado utilizando a metodologia de Klepser *et al* [32], com algumas modificações.

Para a realização da cinética de morte microbiana foram utilizadas duas cepas de *C. parapsilosis*, uma padrão da ATCC 22019 e outra cepa clínica (LM-82). Neste ensaio, frente às concentrações inibitórias mínimas do eugenol observando o comportamento das cepas de leveduras selecionadas ao longo de 24h.

Inicialmente, 100  $\mu\text{L}$  RPMI 1640 (Sigma-Aldrich®/São Paulo-SP/Brasil) foram adicionados em uma microplaca com fundo em "U" com 96 orifícios utilizando 10  $\mu\text{L}$  do sobrenadante das cavidades correspondente à concentração inibitória e as duas concentrações imediatamente mais concentradas (CIM, CIMx2 e CIMx4) e incubadas por um período 24-48 horas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Em seguida o plaqueamento do inóculo foi realizado em Placa Petri (Alamar Tecno Científica LTDA®) contendo o meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose (Difco®), e uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  do inóculo foi retirado com uma alça bacteriológica calibrada (INLAB Confiança, Brasil) e posteriormente semeado de forma uniforme em formato de estrias ao longo da superfície do meio ASD, durante os intervalos de tempo 0 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h e 24 h. As placas inoculadas foram incubadas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 48 horas.

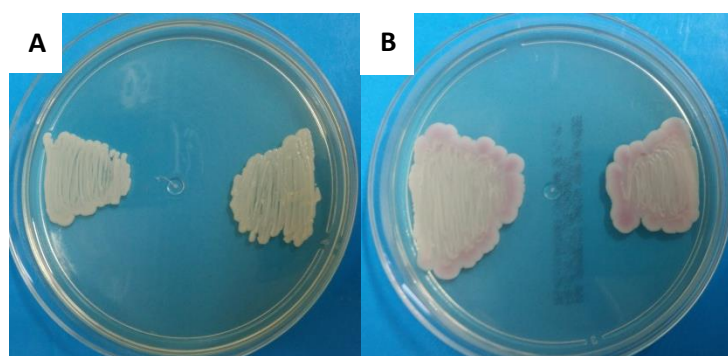
O experimento foi realizado em triplicata. As curvas foram construídas plotando a contagem média de colônias ( $\log_{10}\text{UFC/mL}$ ) em função do tempo (horas). Foi considerada atividade fungicida da droga quando houve redução no crescimento maior ou igual a  $3 \log_{10}$  ( $\geq 99,9\%$ ) a partir do inóculo inicial, e atividade fungistática quando houve redução no crescimento menor que  $3 \log_{10}$  ( $< 99,9\%$ ) UFC/ mL) [32].

### **Análise dos dados**

Os dados da CIM, CFM e do Ensaio da Associação foram analisados por meio da estatística inferencial e descritiva. A curva de cinética de crescimento microbiana foi plotada pelo log<sub>10</sub>UFC/mL em função do tempo e das concentrações estudadas, sendo assim para esse experimento, a análise estatística se deu pelos testes de Kruskal-Wallis e Dunn considerando um nível de significância de 0.05 ( $p < 0,05$ ). Foi utilizado o Software GrafPad (GraphPad for Windows, San Diego, CA – USA) para gerar os resultados da presente pesquisa.

### **3.3 Resultados**

Foi realizado o isolamento e identificação da espécie de *Candida parapsilosis* dos 20 participantes da pesquisa (Figura 1). Das espécies encontradas, *C. parapsilosis*, apresentou uma frequência de 15,3% entre as espécies encontradas. A figura (A) mostra as características fenotípicas inerentes ao gênero *Candida*, crescidas em Ágar Sabouraud Dextrose após 48h em estufa, é possível evidenciar colônias crescidas em forma de estrias, branco-amarelado, opacas e lobuladas. Na figura (B) foi realizou-se um repique das colônias da primeira placa em seguida foi feita a identificação em CHROMOagar-*Candida* resultando em colônias branco-rósea característico da espécie de *C. parapsilosis*.



**Fig.1: A-** Crescimento das colônias em meio sólido Ágar Sabouraud Dextrose após 48 horas da realização do esfregaço; **B-** Crescimento de colônias de *Candida parapsilosis* em CHROMOagar-*Candida*.

De acordo com o *screening* realizado com os quatro produtos (Tabela 1), o eugenol foi o produto que obteve melhor resultado contra as cepas de *Candida parapsilosis* LM-70 e a ATCC 22019. Por outro lado, as espécies ensaiadas mostram-se resistentes aos óleos essenciais de diferentes lotes da *Eugenia uniflora* (pitanga). Os resultados estão expostos na tabela abaixo (Tabela 1).

Óleos essenciais						
Nome Científico	Família	Nome popular	CIM(µg/mL)		Densidade g/cm <sup>3</sup>	Lote
			A*	B**		
<i>Eugenia uniflora</i>	Myrtacea	Pitanga	1024	1024	0,905	0717/05209/F Quinare®
<i>Eugenia uniflora</i>	Myrtacea	Pitanga	1024	1024	1,044	5579lmv Sigma Adldrich®
<i>Mentha piperita L.</i>	Lamiaceae	Menta	64	64	0,899	5579lmv Sigma Adldrich®

Fitoconstituente							
Nome	Fórmula molecular	CIM (µg/mL)		Densidade g/cm <sup>3</sup>	Ponto de fusão °C	Massa molar g/mol	Lote
		A	B				
Eugenol	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	32	32	1,06 g/cm <sup>3</sup>	-7,5	164,2 g/mol	024 Sigma Adldrich®

**Tabela 1:** Resultados do *screening* dos produtos para avaliação da resposta antifúngica. Técnica de microdiluição (1024µg/mL a 32µg/mL). \*Cepa ATCC 22019 \*\*CEPA LM-70.

Logo abaixo está representado (Tabela 2) o resultado do ensaio da microdiluição para as seis cepas clínicas e a padrão ATCC 22019. A CIM para o eugenol em 100% das cepas testadas foi de 256 µg/mL, enquanto que para nistatina as espécies testadas não foram sensíveis na concentração de 1024 µg/mL. Também é possível verificar na tabela os valores referentes às concentrações fungicidas mínimas.

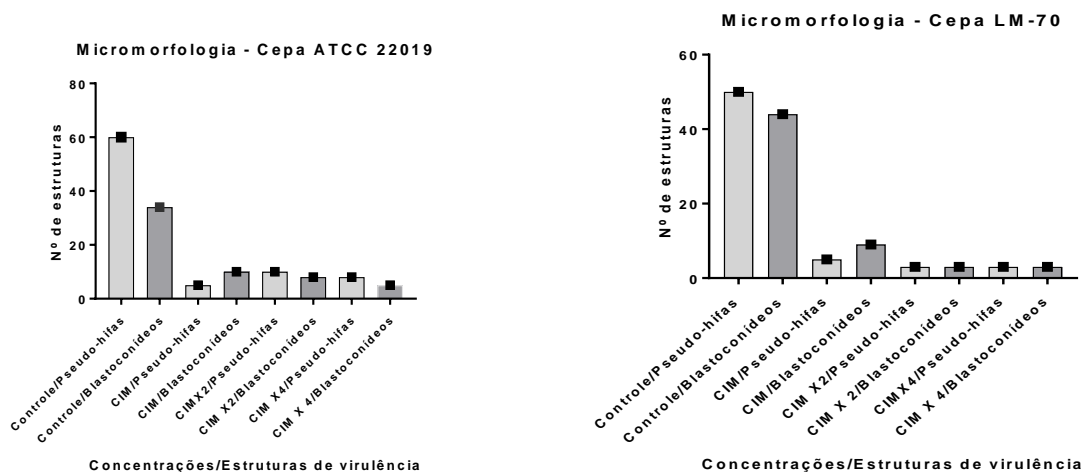
<i>Candida parapsilosis</i>	Eugenol (µg/mL)				Nistatina (µg/mL)	Controle das cepas** RPMI + MO	Controle do meio***
	CIM*	CFM	CFM/CIM	Atividade antifúngica	CIM**		
ATCC 22019	256	256	1	Fungicida	+	+	-
LM-1	256	256	1	Fungicida	+	+	-
LM-2	256	256	1	Fungicida	+	+	-
LM-7	256	256	1	Fungicida	+	+	-
LM-70	256	256	1	Fungicida	+	+	-
LM-225	256	256	1	Fungicida	+	+	-
LM-302	256	256	1	Fungicida	+	+	-

**Tabela 2:** Resultados da avaliação da CIM e CFM do eugenol e nistatina sobre *C. parapsilosis* CIM\*(Eugenol)<sub>100%:64µg/mL</sub>

\*\* : Houve crescimento na maior concentração analisada

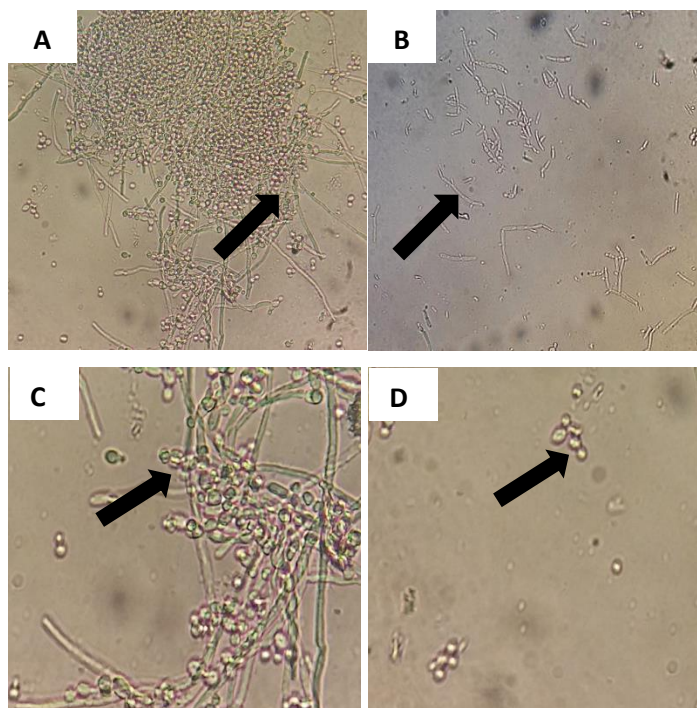
\*\*\* : Sem crescimento de micro-organismo

Os dados da micromorfologia estão notificados através das médias das estruturas de virulência realizada através da contagem de três campos das lâminas observados sob microscopia óptica para o controle e as concentrações estudadas (Gráfico 1 e 2). Ainda é possível evidenciar as estruturas na ausência e presença do eugenol (Figura 2 - A, B, C, D).



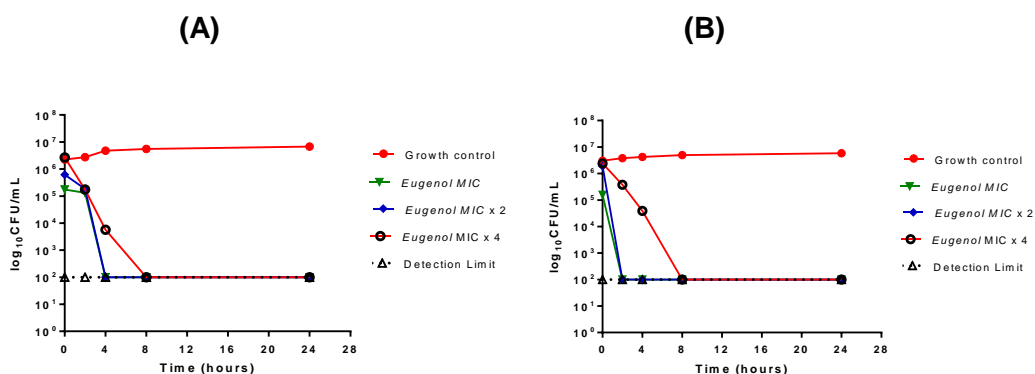
**Gráfico 1:** Crescimento/inibição de pseudo-hifas e blastoconídeos na cepa ATCC 22019 na presença do eugenol nas concentrações CIM, CIMX2 e CIMX4 e na ausência (controle)

**Gráfico 2:** Crescimento/inibição de pseudo-hifas e blastoconídeos na cepa clínica LM-70 na presença do eugenol nas concentrações CIM, CIMX2 e CIMX4 e na ausência (controle)



**Fig. 2:** Micromorfologia em microscopia óptica (aumento 400X) na ausência (controle) e presença do eugenol. **(A)** *C.parapsilosis* ATCC22019 na ausência do produto, demonstrando estruturas como blastoconídeos e pseudo-hifas. **(B)** *C.parapsilosis* ATCC 22019 na presença do fitoconstituinte, observa-se poucas leveduras e pseudo-hifas. **(C)** *C. parapsilosis* LM-70 na ausência do eugenol exibindo grande quantidade de estruturas celulares, blastoconídeos e pseudo-hifas. **(D)** *C.parapsilosis* LM-70 sob ação da CIM do eugenol, poucas estruturas celulares.

Os gráficos da Figura 3 mostram o  $\log_{10}$ UFC/mL em função do tempo de exposição à presença do eugenol para a *C.parapsilosis* ATCC 22019, *C.parapsilosis* LM-70 e o grupo controle (CIM, CIMx2 e CIMx4). Para a cepa padrão sob efeito do eugenol houve uma redução do crescimento para a concentração de CIM e CIMx2 quatro horas depois do início do ensaio. A cepa clínica exposta ao produto apresentou redução do crescimento no tempo de duas horas após o início do experimento na CIM e na CIMx2. A partir do tempo referente a 4 horas nenhum crescimento fúngico foi evidenciado.



**Figura 3:** Curva de tempo-morte microbiana para o efeito antifúngico do Eugenol (A) Cepa ATCC 22019 (B) a cepa clínica LM-70; nas concentrações CIM, CIMX2, CIMX4 nos tempos 0, 2, 4, 8, 12, 24h.

### 3.4 Discussão

A incidência de infecções fúngicas causadas por *C. parapsilosis* tem aumentado exponencialmente [4,10]. Na Europa têm ocorrido uma despolarização nos índices epidemiológicos das doenças fúngicas invasivas com aumento significativo de infecções causadas por espécies não-*albicans*, destacando-se *C. parapsilosis* [33].

No Brasil são escassos para estudos com espécies não-*albicans*, especialmente *C. parapsilosis*. A frequência de *C. parapsilosis* foi expressa em um estudo multicêntrico entre o período de 2003 e 2004 em 11 hospitais de nove cidades brasileiras constatando-se que *C. parapsilosis* representou a terceira espécie predominante [34].

Na cavidade bucal é possível verificar uma larga colonização por espécies *albicans* e não-*albicans*. Nesta pesquisa diagnosticou-se uma prevalência de 15,3% para *Candida parapsilosis*, caracterizando a espécie como sendo a terceira mais predominante nos isolados bucais dos indivíduos participantes. Essa frequência pode ser justificada pelos mecanismos de *quórum sensing* expressado pela espécie mediante as outras comunidades microbianas, tal mecanismo permite que os micro-organismos estabeleçam relações, monitore sua densidade populacional e principalmente regulem a expressão gênica, controlando a formação de biofilmes e vias de sinalização de fatores de virulência. Esses dados convergem para o estudo de Mohiddin et al., [35] o qual avaliou a prevalência de espécies *albicans* e não-*albicans* em uma amostra composta por 50 crianças portadoras de Síndrome de Down e mais 50 crianças que constituíram o grupo controle, os resultados apresentados demonstrou que a *Candida parapsilosis* figurou como sendo a terceira espécie encontrada em ambos os grupos. Sharma e colaboradores [1] apontam em seus estudos que a *C. parapsilosis* foi o tipo de levedura mais encontrada em indivíduos diabéticos tipo II. Esses dados comprovam a presença dessa espécie na população microbiana bucal, emergindo como um patógeno importante no desencadeamento das micoses bucais.

Entre os produtos analisados, o eugenol foi o que obteve melhor atividade antifúngica na triagem dos produtos. Por outro lado, 100% das cepas ensaiadas mostram-se resistentes a *Eugenia uniflora*. Resultados semelhantes foram encontrados por Castro e Lima [36] em que 66,7% das cepas de *Candida albicans* (n=5) e *Candida tropicalis* (n=7) analisadas, apresentou resistência aos óleos essenciais de *E. uniflora*, *C. reticulata*, *M. chamomilla*, e *Z. officinale*. O efeito positivo do eugenol na inibição das cepas analisadas pode ser justificado pela reação química que ocorre entre hidroxila (OH) presente no fitoconstituente e os componentes da membrana celular fúngica, ocorrendo o colapso celular resultando na morte das leveduras [37].

Para o teste de microdiluição a atividade antifúngica do eugenol ficou em 256 µg/mL. Resultados semelhantes foram descritos por Paula et al., [38] que obteve uma inibição de 90% para a concentração 375 µg/mL para cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis* isoladas da cavidade bucal de pacientes soro positivos. Em contrapartida Fontanella et al., [39], determinou uma CIM de 620 µg/mL para o eugenol sob cepas de *C. parapsilosis* isoladas de cães, o que pode sugerir uma maior resistência das cepas isoladas desses animais quando comparado com as da cavidade bucal desse estudo.

A CFM coincidiu com a CIM em todas as cepas ensaiadas. De acordo com os parâmetros estabelecidos por Saddiq e Khayyat [30] a substância possui uma atividade fungistática quando a relação CFM/CIM  $\geq 4$  e fungicida quando CFM/CIM  $< 4$ . Já a metodologia de Hafidh et al. [40] considera essa relação 1:1 e 2:1 o produto é considerado fungicida e fungistático com a razão maior que 2:1. Adotando essas metodologias, o eugenol demonstrou ter atividade fungicida. Em contrapartida, nos estudos de Marcos Arias et al. [41] evidenciou-se resistência das cepas de *C. parapsilosis* frente ao eugenol, já para *C. albicans*, *tropicalis* e *glabrata* foi encontrada valores de CFMs semelhantes ao da CIM (50 $\mu$ g/mL), esses achados comprovam um perfil de menor sensibilidade de *C. parapsilosis* perante a substâncias antifúngicas.

O estudo das estruturas de virulência através do ensaio da micromorfologia demonstrou uma diminuição nos fatores analisados (pseudo-hifas e blastoconídeos) (Gráfico 1 e 2) demonstrando uma dependência da concentração do fitoconstituente para inibir o crescimento das estruturas (Figuras 2 A,B,C,D). Os fatores de virulência tem a capacidade produzir a doença, tornando o fungo mais virulento durante o processo infeccioso [42]. Uma possível explicação do mecanismo de ação do eugenol sob esses fatores, é que supostamente a molécula pode agir inibindo a via de sinalização MAP-K (Mitogen-Activated Protein - Kinase) responsável por ativar o gene Cph1 que proporciona a fase filamentosa como também do CLA4, fator responsável pela formação de tubo germinativo de hifas. Sugere-se então, que os futuros estudos concentrem na elucidação do mecanismo de ação do eugenol sobre a via MAP-K com intuito de esclarecer e consolidar o mecanismo de ação do eugenol sobre a inibição dos fatores de virulência.

No ensaio da cinética, duas cepas de *Candida parapsilosis* (ATCC 22019, LM-70) foram submetidas ao teste de cinética de morte microbiana. Esse experimento realiza uma contagem do número das unidades formadoras de colônias por mL (CFU/mL), verificando se o produto testado tem ação fungicida ou fungistática, além de analisar a interação entre o produto e o micro-organismo, a fim de caracterizar uma relação dinâmica entre a concentração e a atividade ao longo dos tempos avaliados. Analisando os dados expressos na Figura 2-A, para a cepa 22019 observou uma diminuição de 3 log<sub>10</sub>UFC/mL para as concentrações de CIM. CIMX2 nas primeiras quatro horas do teste de oito horas em diante não foi observado crescimento fúngico, já para a cepa clínica LM-70 em quatro horas o produto já tinha matado 99,9% das células viáveis. Em ambas as curvas de morte microbiana o produto teve ação fungicida de acordo com critérios preconizados por Klesper et al. [32].

Nas condições deste experimento observou-se um perfil de resistência da nistatina em relação às cepas ensaiadas, não sendo possível determinar CIM para o antifúngico, supondo-se que a concentração para sensibilidade destas cepas seja superior a 1024  $\mu$ g/mL. Corroborando com esse estudo Freire et al [43], relata em seus estudos um quadro de resistência a nistatina frente a *Candida albicans* isoladas da cavidade bucal de indivíduos usuários de prótese. Tal fato pode ser explicado pela facilidade ao acesso dos antifúngicos disponíveis e o uso desordenado pela população, somado a isto, as pesquisas farmacêuticas para o desenvolvimento de fármacos são mais voltados para drogas antibacterianas quando comparado aos antifúngicos, tornando o arsenal de drogas antifúngicas mais limitadas quando comparado aos antibacterianos [44]. Dessa forma, torna-se imperante à utilização de forma cautelosa das drogas antifúngicas disponíveis no mercado, como também os dados desta pesquisa ratifica a importância de desenvolvimento de novas terapias complementares para o tratamento das infecções orais fúngicas.

### 3.5 Conclusões

Os resultados permitem concluir que *C. parapsilosis* constitui uma espécie prevalente nos isolados bucais dos indivíduos da amostra estudada, podendo ser caracterizado como um fungo emergente no desenvolvimento da candidíase oral. O eugenol atingiu um efeito fungicida sobre as cepas testadas, interferindo no processo no processo de formação das estruturas de virulência e tendo um efeito inibitório sobre as células viáveis na curva de morte microbiana. As perspectivas para os próximos estudos concentram-se em testes *in vitro* sobre estruturas alvos específicas do fitoconstituente na célula fúngica, citotoxicidade bem como em modelos animais.

### Referências

1. Sharma U, Patel K, Shah V, Sinha S, Rathore VPS. Isolation and Speciation of Candida in Type II Diabetic Patients using CHROM Agar: A Microbial Study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2017; 11:9-11.
2. Ping-Feng Wu, Wei-Lun Liu, Min-Han Hsieh, Ing-Moi Hii, Yu-Lin Lee, Yi-Tsung Lin, et al. Epidemiology and antifungal susceptibility of candidemia isolates of non-albicans Candida species from cancer patients. *Emerging Microbes & Infections*, 2017; 6:1-7.
3. Trofa D, Soghier L, Long C, Nosanchuk JD, Gácsér A, Goldman DL. A Rat Model of Neonatal Candidiasis Demonstrates THE Importance of Lipases as Virulence Factors for *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*. *Mycopathologia*. 2011; 172: 169-178.
4. Nosek J, Holesova Z, Kosa P, Gacsér A, Tomaska, L. Biology and genetics of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Current Genetics*. 2009; 55:497-509.
5. Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk J.D. *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*. 2008; 21(4): 606-625.
6. Gableri IG, Barbosa AC, Velela RR, Lyon S, Rosa, CA. Incidence and anatomic localization of oral candidiasis in patients with AIDS hospitalized in a public hospital in Belo Horizonte, MG, Brazil. *Journal Applied Oral Science*. 2009; 16:247-250.
7. Tay LY, Jorge JH, Herrera DR, Campanha NH, Gomes BP, Santos FA. Evaluation of different treatment methods against denture stomatitis: a randomized clinical study. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*. 2014;118:72-77.
8. Ainapur MMAR, Mahesh P, Kumar KV, Deepak A, Mrinal U, Sharada P. An in vitro study of isolation of candidal strains in oral squamous cell carcinoma patients undergoing radiation therapy and quantitative analysis of the various strains using CHROMagar. *Journal of oral and maxillofacial pathology*. 2017; 21:11-17.
9. Wingeter MA, Guilhermetti E, Shinobu CS, Takaki I, Svidzinski TIE. Identificação microbiológica e sensibilidade in vitro de Candida isoladas da cavidade oral de indivíduos HIV positivos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2017; 40(3): 272-276.
10. Pemán J, Cantón E, Quindós G, Eraso E, Alcoba J, Guinea J, et al. Epidemiology, species distribution and *in vitro* antifungal susceptibility of fungaemia in a Spanish multicentre prospective survey. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2012;67:1181-1187.
11. Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal Microbiology*. 2004; 5: 275-280.
12. Daniel AN, Sartoretto SM, Schmidt G, Caparroz-Assef SM, Bersani-Amado CA, Cuman RKN. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of eugenol essential oil in experimental animal models. *Brazilian Journal Pharmacognosia*. 2009;19: 212-217.
13. Ferreira FM, Delmonte CC, Novato TLP, Monteiro CMO, Daemon E, Vilela FMP, Amaral MPH. Acaricidal activity of essential oil of *Syzygium aromaticum*, hydrolate and eugenol formulated or free on larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus*. *Medical and Veterinary Entomology*. 2017;2017:1-7.
14. Chiluka L, Shastry YM, Gupta N, Reddy KM, Prashanth NB, Sravanthi K. An in vitro Study to evaluate the effect of eugenol-free and eugenol-containing temporary cements on the bond strength

- of resin cement and considering time as a factor. *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry*. 2017; 7: 202-207.
15. Guenette SA, Beaudry F, Marier JF, Vachon P. Pharmacokinetics and anesthetic activity of eugenol in male Sprague–Dawley rats. *Journal Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 2006; 29: 265–270.
  16. Hidalgo ME, De la Rosa C, Carrasco H, Cardona W, Gallardo C, Espinoza L. Antioxidant capacity of eugenol derivatives. *Quimica Nova*. 2009; 32:1467-1470.
  17. Lodder I. *The Yeast: a Taxonomic study*. Amsterdam: Horth Helland Publishing; 1970.
  18. Hoog GS, Guarro J. *Atlas of clinical fungi*. Central bureau voorschimm el cultures.Virgii: Universitant Rovira; 1995.
  19. Kurtzmann CP, Fell JW. *The yeast: a taxonomic study*. 4. ed. New York: Elsevier; 1998.
  20. Sidrim JJC, Rocha MFG. *Micologia Médica à luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara; 2004.
  21. Borsato DM, Esmerino LA, Farago PV, Miguel MD, Miguel OG. Atividade antimicrobiana de méis produzidos por meliponíneos nativos do Paraná (Brasil). *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*. 2013; 31:57-66.
  22. Espinel-Ingroff A, Chaturvedi V, Fothergill A, Rinaldi MG. Optimal testing coditions for determining MICs and minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for uncommon molds: NCCLS collaborative study. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002; 40:3776-3781
  23. Cleeland R, Squires E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections. In: Lorian VMD. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Willians & Wilkins. 1991; 1991:739-788.
  24. Ellof JN. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica*. 1998; 64:711-713.
  25. Hadacek F, Greeger H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparatibility of results and assay choice. *Phytochemical Analysis*. 2000; 11:137-147.
  26. Konemam EW, Winn WC, Allen SD, Janda WM, Procop GW, Scherckenberger PC. et al. *Diagnóstico microbiológico*. 5 ed. Rio de Janeiro: MEDS; 2001: 551-588.
  27. Clinical and Laboratory Standards Institute: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. 3 edition. CLSI, Wayne, PA, USA; 2010, CLSI document M27-A3 and Supplement S3.
  28. Houghton PJ, Howes MJ, Lee CC, Steventon G. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. *Journal Etnopharmacology*. 2007; 110:391-400.
  29. Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Dias-Filho BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem. Instit Oswaldo Cruz*, 2002; 97:1027-1031
  30. Saddiq AA, Khayyat SA. Chemical and antimicrobial studies of monoterpene: Citral. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2010; 98 :89–93.
  31. Dalmau LM. Remarques sur la technique mycologique. *Ann Parasitol Hum Com*. 1929. 7: 536-545.
  32. Klepser ME, Ernst EJ, Lewis RE, Ernst ME, Pfaller MA (1998) Influence of test conditions on antifungal timekill curve results: Proposal for standardized methods. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*.2008; 42:1207–1212.
  33. Lass-Flörl, C. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses*. 2009; 52:197-205.
  34. Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouer SA, Arthington-Skaggs B, Da Matta DA, et al. Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006; 44: 2816-2823.
  35. Mohiddin G, Narayanaswamy AB, Masthan KMK, Nagarajan A, Panda A, Behura SS. Oral Candidal and Streptococcal carriage in Down syndrome patients. *Journal of natural science, biology, and medicine*. 2015; 6:300-305.
  36. Castro RD, Lima, EO. Screening da atividade antifúngica de óleos essenciais sobre cepas de *Candida*. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*, 2011; 11(3): 203-208.
  37. Ahmad A, Khan A, Khan LA, Manzoor N. In vitro synergy of eugenol and methyleugenol with fluconazole against clinical *Candida* isolates. *J Med Microbiol*.2010; 59: 1178-1184.
  38. Paula SB, Bartelli TF, Di Raimo V, Santos JP, Morey AT et al. Effect of eugenol on cell surface hydrophobicity, adhesion, and biofilm of *Candida tropicalis* and *Candida dubliniensis* isolated from

- oral cavity of HIV-infected patients. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014;1-8.
39. Fontenelle RO, Morais SM, Brito EH, Brilhante RS, Cordeiro RA, Lima, YC, Rocha MF. Alkylphenol activity against *Candida* spp. and *Microsporum canis*: a focus on the antifungal activity of thymol, eugenol and O-methyl derivatives. *Molecules*. 2011;16 (8): 6422-6431.
  40. Hafidh RR, Abdulmir AS, Vern LS, Bakar FA, Abas F, Jahanshiri F, et al. Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. *Open Microbiology Journal*. 2011; 5:96–106.
  41. Marcos-Arias C, Eraso E, Madariaga L, Quindós, G. In vitro activities of natural products against oral *Candida* isolates from denture wearers. *BMC Complementary Alternative Medicine*. 2011; 111-119.
  42. Karkowska-Kuleta J, Kozik A, Rapala-Kozik, M. Binding and activation of the human plasma kinin-forming system on the cell walls of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Biological chemistry*. 2010, 391: 97-103.
  43. Freire, JCP, Oliveira-Júnior, JKO, Silva, DDF, Sousa, JPD, Guerra, FQS, Lima, EO. Antifungal Activity of Essential Oils against *Candida albicans* Strains Isolated from Users of Dental Prostheses. *Evidence-Based. Complementary. and Alternative Medicine*. 2017; 2017:1-10.
  44. Sifuentes-Osornio J, Corzo-León DE, Ponce-de-León, LA. Epidemiology of Invasive Fungal Infections in Latin America. *Current Fungal Infection Reports*. 2012, 6: 23-34.

#### 4. CONSIDERAÇÕES GERAIS

O gênero *Candida* pode desencadear infecções fúngicas em diversas regiões do corpo humano, como por exemplo, a cavidade oral. A candidíase oral apresenta maior prevalência de espécies *albicans*, todavia espécies não-*albicans* têm mostrado coparticipação significativa no desenrolar da patologia, especialmente em estados mais avançados ou em quadros de resistência dessas espécies as terapias licenciadas, o que dificulta o tratamento, gerando um quadro de risco para o indivíduo conseqüentemente tornando um problema de saúde pública.

Este estudo teve como objetivo isolar, identificar leveduras do gênero *Candida* da cavidade bucal de indivíduos saudáveis sistematicamente e avaliar o perfil antifúngico *in vitro* do fitoconstituente eugenol presente em diversas plantas que são utilizadas pela população.

A amostra da pesquisa consistiu em 20 indivíduos (n=20), com idade média de 50,6 anos e maior prevalência para o sexo feminino. A frequência de espécies não-*albicans* concentrou-se em uma porcentagem de 48,7%, sendo as espécies de *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* as espécies mais encontradas após *Candida albicans*.

Segundo Mímica et al (2009), pesquisas na América do Norte e Europa apontam *C. glabrata* como sendo a espécie não-*albicans* mais prevalente envolvidas em infecções; no Brasil, *C. tropicalis* tem ocupado essa colocação.

No Canadá foi realizado um estudo durante um período de cinco anos, o qual revelou que *C. parapsilosis* é a terceira espécie mais prevalente em candidemias invasivas.

No Brasil, são raros os estudos com espécies não-*albicans*, em especial com *C. parapsilosis*, sendo os dados nacionais escassos quando se tratando da referida espécie, os estudos são do tipo observacional e com número limitado a hospitais e revisões retrospectivas. A frequência de *C. parapsilosis* foi expressa em um estudo multicêntrico entre o período de 2003 e 2004 em 11 hospitais de nove cidades brasileiras constatando-se que *C. parapsilosis* representou a terceira espécie predominante.

Diante de todos os achados da literatura e do presente estudo, o eugenol tem mostrado um potencial promissor para o desenvolvimento de novos produtos à base de produtos naturais.

Esta investigação representa um estudo da atividade antifúngica do fitoconstituente eugenol frente às espécies de *Candida* não-*albicans*, incluindo algumas resistentes a antifúngicos sintéticos, isoladas de usuários da cavidade bucal de indivíduos saudáveis.

Como todo estudo científico, a presente pesquisa, apresenta limitações como o número reduzido leveduras isoladas para traçar o perfil epidemiológico da presença de *Candida albicans* e não-*albicans* nos indivíduos analisados, sendo a demanda baixa pelo atendimento justificada por características inerentes a fatores culturais da comunidade. Ainda, trata-se de um estudo inicial, *in vitro*, porém com cepas clínicas.

No entanto, os resultados norteiam para futuros estudos que envolvam a avaliação da citotoxicidade, atividade antibiofilme, ensaios *in vitro* mais específicos, como por exemplo, em estruturas alvo da célula fúngica e perfil mutagênico, associação do eugenol com outros antifúngicos sintéticos licenciados e em modelos animais.

## 5. CONCLUSÃO

- As espécies de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* foram as mais prevalentes no isolamento e identificação respectivamente;
- O eugenol apresentou maior atividade antifúngica dentre as substâncias analisadas;
- A CIM para o eugenol em 90% das cepas de *C. tropicalis* analisadas foi de 64 µg/ mL e de 256 µg/ mL para *C. parapsilosis* em 100% das espécies ensaiadas;
- A substância teste revelou efeito fungicida sobre as cepas testadas;
- O estudo de associação do eugenol com antifúngico padrão licenciado (nistatina) mostrou-se uma atividade antagônica, revelando uma valor de ICIF de 8 (oito) para a cepa ATCC 13803 e 6 (seis) para a cepa clínica LM-34;
- O eugenol interferiu no processo de formação de estruturas de virulência importantes no desenvolvimento do processo infeccioso;
- A cinética de morte microbiana revelou um efeito fungicida do eugenol nas três concentrações estudadas no tempo de 24 horas em ambas as espécies testadas.

## REFERÊNCIAS\*

1. Ahmad A, Khan A, Khan LA, Manzoor N. In vitro synergy of eugenol and methyleugenol with fluconazole against clinical *Candida* isolates. *J Med Microbiol.*2010; 59(10): 1178-1184.
2. Almeida LFD, Cavalcanti YW, Castro RD, Lima EO. Atividade antifúngica de óleos essenciais frente a amostras clínicas de *Candida albicans* isoladas de pacientes HIV positivos. *Revis. Bras. Plantas Med*, 2012; 30(4): 649-655.
3. Bennett JE. Agentes Antimicrobianos: Agentes Antifúngicos. In: Goodman & Gilman. *As bases farmacológicas da terapêutica*. Editor: Brunton LL. Editores associados: Lazo JS, Parker KL. 11ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill Interamericana do Brasil, 2006 48:1103-1118.
4. Berman J. *Candida Albicans*. *Curren. Biol.*, v.22, n.16, p.620-622, 2012.
5. Bettega PVC, Czulniak GR, Piva R, Namba EL, Ribas CR, Grégio AMT, Rosa EAR. Fitoterapia: dos canteiros ao balcão da farmácia. *Arch. Oral res.* 2011; 7(1): 89-97, 2011.
6. Borsato DM, Esmerino LA, Farago PV, Miguel MD, Miguel OG. Atividade antimicrobiana de méis produzidos por meliponíneos nativos do Paraná (Brasil). *Bol. Cent. Pesq. Proces. Alim.* 2013; 31(1): 57-66.
7. Braga PC, Dal Sasso M, Culici M, Alfieri M. Eugenol and thymol, alone or in combination, induce morphological alterations in the envelope of *Candida albicans*. *Fitot.* 2007; 78(6):396-400.
8. BRASIL. Ministério da Saúde. Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. Brasília. DF. 2006. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica\\_nacional\\_fitoterapicos.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf)> Acesso em: 04/05/2016.
9. Chandrasekar P. Management of invasive fungal infections: a role for polyenes. *Journal antimicrob. Chemother.*; 66(3):457–465, 2011.
10. Crocco EI, Mimica LM, Muramatu LH, Garcia C, Souza VM, Ruiz LR, Zaitz C. Identification of *Candida* species and antifungal susceptibility in vitro: a study on 100 patients with. *An Bras Dermatol.* 2004; 79(6):689-697.
11. Daniel AN, Sartoretto SM, Schmidt G, Caparroz-Assef SM, Bersani-Amado CA, Cuman RKN. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of eugenol

- essential oil in experimental animal models. *Braz J Pharm*, 2009; 19(1b):212-217.
12. Fontenelle RO, Morais SM, Brito EH, Brilhante RS, Cordeiro RA, Lima YC, Brasil NVGPS, Monteiro AJ, Sidrim JJC, Rocha MF. Alkylphenol activity against *Candida* spp. and *Microsporum canis*: a focus on the antifungal activity of thymol, eugenol and O-methyl derivatives. *Molecules*. 2011;16:622-643.
  13. Freitas DA, Caballero AD, Pereira MM, Oliveira SKM, Silva GPE, Hernández, CIV. Sequelas bucais da radioterapia de cabeça e pescoço. *Rev CEFAC*. 2011; 13(6): 1103-1108, 2011.
  14. Gableri IG, Barbosa AC, Velela RR, Lyon S, Rosa, CA. Incidence and anatomic localization of oral candidiasis in patients with AIDS hospitalized in a public hospital in Belo Horizonte, MG, Brazil. *J Appl Oral Sci*. 2008;16(4):247-250.
  15. Guenette SA, Beaudry F, Marier JF, Vachon P. Pharmacokinetics and anesthetic activity of eugenol in male sprague–dawley rats. *J Vet Pharmacol Ther*. 2006; 29(4): 265–270.
  16. Harvey RA, Champe PC, Fisher BD. *Microbiologia Ilustrada*. Porto Alegre: Artmed, 2008. 213p.
  17. He M, Du M, Fan M, Bian Z. In vitro activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia*. 2007; 163(3):137-143.
  18. Hidalgo ME, De la Rosa C, Carrasco H, Cardona W, Gallardo C, Espinoza L. Antioxidant capacity of eugenol derivatives. *Quim Nova*. 2009; 32: 1467-1470
  19. Mathew BP, Nath, M. Recent approaches to antifungal therapy for invasive mycoses. *ChemMedChem*. 2009; 4(3):310–23.
  20. Menezes EA, Cavalcante MDS, Farias RB, Teixeira AB, Pinheiro FG, Bezerra BP, Torres JCN, Cunha FA. Frequency and enzymatic activity of *Candida albicans* isolated from the buccal mucosa of children of a day-care center of the city hall of Fortaleza, Ceará, Brazil. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 2005;41(1):9-13.
  21. Menezes TOA, Alves ACBA, Santos JMV, Menezes SAF, Alves BP, Vasconcelos LCM. Avaliação in vitro da atividade antifúngica de óleos


- essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. Rev, Odontol. UNESP.2009;38(3):184-91.
22. Mohiddin G, Narayanaswamy AB, Masthan KMK, Nagarajan A, Panda A, Behura SS. Oral Candidal and Streptococcal carriage in Down syndrome patients. J. Nat. Sci. Biolo. and .Med. 2015; 6(2):300-305.
  23. Neville BW, Damm DD, Allen CC, Bouquot JE. Patologia Oral Maxilo-Facial. Rio Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
  24. Nosek J, Holesova Z, Kosa P, Gacser A, Tomaska, L. Biology and genetics of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. Current Genetics. 2009; 55(5):497-509.
  25. Paula SB, Bartelli TF, Di Raimo V, Santos JP, Morey AT et al. Effect of eugenol on cell surface hydrophobicity, adhesion, and biofilm of *Candida tropicalis* and *Candida dubliniensis* isolated from oral cavity of HIV-infected patients. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2014 (2014):1-8.
  26. Peixoto JV, Rocha MG, Nascimento RTL, Moreira VV, Kashiwabara TGB. Candidíase - Uma revisão de literatura. Brazil. Journ. Surg. Clin. Res. 2014, 8(2): 75-82.
  27. Rached-Junior FJA, Sousa-Neto MD, Souza-Gabriel AE, Duarte MAH, Silva-Sousa Y. TC. Impact of remaining zinc oxide-eugenol-based sealer on the bond strength of a resinous sealer to dentine after root canal retreatment. *Int Endo J*. 2014; 47(5):463-469.
  28. Rajakumari ML, Kumari PS. Prevalence of *Candida* species in the buccal cavity of diabetic and non-diabetic individuals in and around Pondicherry. J. Med. Mycol. 2016; 26(4):359-367.
  29. Santos JDD, Piva E, Vilela SFG, Jorge AOC, Junqueira JC. Mixed biofilms formed by *C. albicans* and non-*albicans* species: a study of microbial interactions. Braz Oral Res, 2016; 30(1): 301-8.
  30. Souza CDD, Felfili JM. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. 2006; Acta Bot. Bras. 20(1): 135-142.
  31. Tay LY, Jorge JH, Herrera DR, Campanha NH, Gomes BP, Santos FA. Evaluation of different treatment methods against denture stomatitis: a

- randomized clinical study. Oral sur, oral med, oral patho. and oral radiol, 2014;118(1):72-77. 2014.
- 32.Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. Arch Oral Biol. 2006; 51(8):672-80.
- 33.Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk J.D. *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. Clinical Microbiology Reviews. 2008; 21(4): 606-625.
- 34.Trofa D, Soghier L, Long C, Nosanchuk JD, Gácsér A, Goldman DL. A Rat Model of Neonatal Candidiasis Demonstrates THE Importance of Lipases as Virulence Factors for *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*. Mycopathologia. 2011; 172(3): 169-178.
- 35.Wingeter MA, Guilhermetti E, Shinobu CS, Takaki I, Svidzinski TIE, Identificação microbiológica e sensibilidade in vitro de *Candida* isoladas da cavidade oral de indivíduos HIV positivos. Revis. Soci. Bras. Med.Trop. 2007; 40(3): 272-276.

---

\* 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.

## ANEXO 1 – CERTIDÃO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA




UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

**CERTIDÃO**

Certifico que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba – CEP/CCS aprovou por unanimidade na 6ª Reunião realizada no dia 21/07/2016, o Projeto de pesquisa intitulado: **“SAÚDEARTE: TROCA DE SABERES E DIFUSÃO DA CIDADANIA”**, da pesquisadora Edeltrudes de Oliveira Lima. Prot. nº 0395/16. CAAE: 57435016.4.0000.5188.

Outrossim, informo que a autorização para posterior publicação fica condicionada à apresentação do resumo do estudo proposto à apreciação do Comitê.

  
Andrea M. C. Lima  
MIL. SIAPE 1117510  
Secretária de CEP/CCS-UFPB

---

Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba  
Campus I – Cidade Universitária - 1º Andar - CEP 58051-900 – João Pessoa - PB  
☎ (83) 3216 7791 – E-mail: [eticaccsufpb@hotmail.com](mailto:eticaccsufpb@hotmail.com)

# ANEXO 2 – INSTRUÇÕES AOS AUTORES PARA SUBMISSÃO NO PERIÓDICO JOURNAL OF APPLIED ORAL SCIENCE



ISSN 1678-7757 versão impressa  
ISSN 1678-7765 versão online

216

## INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- [Escopo e política](#)
- [Forma e preparação de manuscritos](#)
- [Envio de manuscritos](#)

### 1 ESCOPO

O periódico **Journal of Applied Oral Science** tem como missão a divulgação dos avanços científicos e tecnológicos conquistados pelas comunidades odontológica e fonoaudiológica, respeitando os indicadores de qualidade, a fim de que seja assegurada a sua aceitabilidade junto à comunidade de pesquisadores da área em nível local, regional, nacional e internacional. Tem como objetivo principal publicar resultados de pesquisas originais no campo das ciências orais, com ênfase em Odontologia, Fonoaudiologia e áreas correlatas.

As submissões de relatos de casos (incluindo séries de casos e protocolos clínicos) não são mais aceitos pelo Journal of Applied Oral Science e os manuscritos de revisão (incluindo revisões sistemáticas) só podem ser submetidos a convite do editor.

Este periódico adota a licença Creative Commons CC-BY:

"Esta licença permite que outros distribuam, remixem, adaptem e criem a partir do seu trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que lhe atribuam o devido crédito pela criação original. É a licença mais flexível de todas as licenças disponíveis. É recomendada para maximizar a disseminação e uso dos materiais licenciados."

#### 1.1 Custo de publicação

Não há cobrança aos autores para submissão de manuscritos e nem mesmo para processamento dos artigos (APC).

### 2 DAS NORMAS GERAIS

2.1 Os trabalhos enviados para publicação devem ser inéditos, não sendo permitida a sua submissão simultânea em outro periódico, seja este de âmbito nacional ou internacional. O Journal of Applied Oral Science reserva todo o direito autoral dos trabalhos publicados, inclusive tradução, permitindo, entretanto, a sua posterior reprodução como transcrição com devida citação de fonte.

2.2 Só serão recebidos para publicação, trabalhos redigidos em inglês, ficando o conteúdo dos textos, das citações e das referências sob inteira responsabilidade dos autores.

2.3 O Journal of Applied Oral Science tem o direito de submeter todos os manuscritos ao Corpo Editorial, o qual está completamente autorizado a determinar a conveniência de sua aceitação, ou devolvê-los aos autores com sugestões e modificações no texto e/ou para adaptação às regras editoriais da revista. Neste caso, o manuscrito será reavaliado pelo Editor-Chefe e Corpo Editorial.

2.4 Os conceitos afirmados nos trabalhos publicados são de inteira responsabilidade dos autores, não refletindo obrigatoriamente a opinião do Editor-Chefe ou Corpo Editorial.

2.5 As datas do recebimento do original e da aceitação do artigo constarão quando da publicação.

2.6 O Journal Applied Oral Science é publicado exclusivamente em formato eletrônico.

### 3 CRITÉRIOS DE ARBITRAGEM

3.1 Pré-Análise: os manuscritos serão submetidos aos Editores Associados - Chefes para apreciação quanto à adequação ao escopo da revista. Caso o manuscrito não esteja dentro dos parâmetros esperados serão rejeitados e devolvidos aos autores.

3.2 Revisão técnica: os trabalhos serão avaliados quanto ao cumprimento das normas de publicação e documentação exigidas na submissão dos manuscritos. Em caso de desacordo com as instruções serão devolvidos aos autores para as devidas adequações antes mesmo de serem submetidos à avaliação pelos Editores Associados e revisores.

3.3 Análise de mérito e conteúdo: os artigos aprovados pelos Editores Associados serão avaliados quanto ao mérito e método científico por no mínimo dois relatores *ad hoc* de unidades distintas à de origem do trabalho, além do Editor-Chefe.

3.3.1 Como parte do processo de avaliação, todos os manuscritos serão submetidos à análise feita por um software de plágio.

3.3.2 O Editor-Chefe decidirá sobre a aceitação do manuscrito. Quando necessária revisão do original, o manuscrito será devolvido ao autor correspondente para modificação. Uma versão revisada com as alterações efetuadas deverá ser re-submetida pelos autores e será reavaliada pelo Editor-Chefe, Editores Associados e revisores conforme a necessidade.

3.4 Após aprovação quanto ao mérito científico, os trabalhos serão submetidos à revisão final da língua inglesa, feita por profissional autônomo indicado pela revista. Nos casos de inadequação os trabalhos serão encaminhados para os autores para revisão.

3.5 Tanto os avaliadores quanto os autores, durante todo o processo de tramitação dos artigos, não são identificados pela outra parte.

3.6 Os conceitos emitidos nos trabalhos publicados serão de responsabilidade exclusiva dos autores, não refletindo obrigatoriamente a opinião do Editor-Chefe ou Corpo Editorial.

### 4 DA CORREÇÃO DAS PROVAS TIPOGRÁFICAS

4.1 A prova tipográfica será enviada ao autor correspondente por meio de correio eletrônico em formato PDF para aprovação final.

4.2 O autor disporá de um prazo de 48 horas para correção e devolução do original devidamente revisado, se necessário.

4.3 Apenas pequenas modificações, correções de ortografia e verificação das ilustrações serão aceitas. Modificações extensas implicarão na reapreciação pelos assessores e atraso na publicação do trabalho.

4.4 Se não houver retorno da prova em 48 horas, o Editor-Chefe considerará como final a versão sem alterações.

4.5 A inclusão de novos autores não é permitida nesta fase do processo de publicação.

4.6 É de inteira responsabilidade dos autores verificarem o devido uso de seus nomes científicos no manuscrito.

### de manuscritos

#### 1 APRESENTAÇÃO DO MANUSCRITO

##### 1.1 Estrutura do manuscrito

1.1.1 Página de rosto deverá ser submetida como arquivo suplementar deverá conter apenas:

## 1 APRESENTAÇÃO DO MANUSCRITO

### 1.1 Estrutura do manuscrito

1.1.1 Página de rosto deverá ser submetida como arquivo suplementar deverá conter apenas:

- O título do manuscrito em inglês.
- Os nomes dos autores na ordem direta seguido da sua afiliação institucional. Para autores brasileiros as afiliações devem vir em português, em espanhol para latino-americanos e em inglês para as demais nacionalidades.
- Endereço completo do autor correspondente, a quem todas as correspondências devem ser endereçadas, incluindo telefone e endereço de e-mail.

### 1.1.2 Texto

- O artigo deverá ser previamente traduzido ou revisado por empresa ou profissional autônomo que assegurem a qualidade do texto. Autores que tenham a língua inglesa como nativa deverão apresentar declaração na qual se responsabilizam pela redação.
- Título do trabalho em inglês;
- Resumo estruturado em parágrafo único: deverá incluir o máximo de 300 palavras, ressaltando-se no texto uma pequena introdução, objetivo, material e métodos, resultados e conclusões.
- Palavras-chave: (correspondem às palavras ou expressões que identificam o conteúdo do artigo). Para determinação das palavras-chave os autores deverão consultar a lista de assuntos do [MeSH](#) e os Descritores em Ciências da Saúde - [DeCS](#). Deve-se usar ponto final para separar as palavras-chave, que devem ter a primeira letra da primeira palavra em letra maiúscula. Ex: Dental implants. Fixed prosthesis. Photoelasticity. Passive fit.
- Introdução: resumo do raciocínio e a proposta do estudo, citando somente referências pertinentes. Estabelecer a hipótese do trabalho.
- Material e Métodos: o material e os métodos são apresentados com detalhes suficientes para permitir a confirmação das observações. Incluir cidade, estado e país de todos os fabricantes depois da primeira menção dos produtos, reagentes ou equipamentos. Métodos publicados devem ser referenciados e discutidos brevemente, exceto se modificações tenham sido feitas. Indicar os métodos estatísticos utilizados, se aplicável. Consultar o item 3 para princípios éticos e registro de ensaios clínicos.
- Resultados: apresenta os resultados em uma sequência lógica no texto, com tabelas e ilustrações. Não repetir no texto todos os dados das tabelas e ilustrações, enfatizando somente as observações importantes. Utilizar o mínimo de tabelas e ilustrações possível.
- Discussão: enfatizar os aspectos novos e importantes do estudo e as conclusões resultantes. Não repetir em detalhes dados ou informações citadas na introdução ou resultados. Relatar observações de outros estudos relevantes e apontar as implicações de seus achados e suas limitações.
- Conclusão(ões): (quando houver).
- Agradecimentos (quando houver) - agradeça a pessoas que tenham contribuído de maneira significativa para o estudo. Especifique auxílios financeiros citando o nome da organização de apoio de fomento e o número do processo.
- Referências (ver item 2.3)

## 2 NORMALIZAÇÃO TÉCNICA

O manuscrito deve ser digitado com: espaçamento de 1,5, fonte Arial, tamanho 11, 3 cm de margem de cada um dos lados, papel A4, perfazendo um total de, no máximo, 15 páginas, incluindo ilustrações (gráficos, fotografias, tabelas etc).

### 2.1 Ilustrações e Tabelas

2.1.1 As ilustrações (fotografias, gráficos, desenhos, quadros etc.), serão consideradas no texto como figuras, sendo limitadas ao mínimo indispensáveis e devem ser adicionadas em arquivos separados, numeradas consecutivamente em algarismos arábicos segundo a ordem em que aparecem no texto.

2.1.2 As ilustrações deverão ser encaminhadas em formato .tiff. ou .jdd. com no mínimo 300 dpi de resolução e 10 cm de largura. Esses

2.1.3 As tabelas deverão ser logicamente organizadas, numeradas consecutivamente em algarismos arábicos. A legenda será colocada na parte superior das mesmas. As tabelas deverão ser abertas nas laterais direita e esquerda. As tabelas deverão ser enviadas em formato .xls.

2.1.4 As legendas correspondentes deverão ser claras, concisas e localizadas ao final do trabalho em forma de lista separada e precedidas da numeração correspondente.

2.1.5 As notas de rodapé de ilustrações e tabelas serão indicadas por asteriscos e restritas ao mínimo indispensável.

### 2.2 Citação de autores

A citação dos autores no texto poderá ser feita de duas maneiras:

- 1) Somente numérica: "... and interfere with the bacterial system and tissue system"<sup>9,4,7-10</sup>. As referências devem ser citadas em ordem crescente no parágrafo.
- 2) ou alfanumérica:
  - Um autor: Gatewood<sup>21</sup> (2012)
  - Dois autores: Cotti and Mercurio<sup>19</sup> (2016)
  - Três autores: Azar, Safi, Nikaiein<sup>27</sup> (2012)
  - mais que três autores: Gealth, et al.<sup>28</sup> (2014)
  - Caracteres de pontuação tal como pontos e vírgulas devem ser colocados depois da citação numérica dos autores. Ex: Ferreira<sup>28</sup> (2015).

### 2.3 Referências

As Referências deverão obedecer aos requisitos "Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journals - Vancouver", para a submissão de manuscritos a revistas biomédicas - disponível no seguinte endereço eletrônico:

[http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

2.3.1 Toda referência deverá ser citada no texto. Elas devem ser ordenadas de acordo com sua apresentação no texto e numeradas sequencialmente em ordem crescente. As abreviaturas dos títulos dos periódicos internacionais citados deverão estar de acordo com o padrão [MEDLINE](#).

2.3.2 Não incluir comunicações pessoais e materiais bibliográficos sem data de publicação na lista de referências.

2.3.3 Teses, dissertações, monografias e resumos não serão aceitos como referências.

2.3.4 Listar os nomes dos 6 primeiros autores do trabalho; excedendo este número, os 6 primeiros autores do trabalho devem ser citados, seguidos pela expressão ", et al.", que deve ser seguida por ponto e não escrita em itálico. Ex: Cintra LT, Samuel RO, Azuma MM, Ribeiro CP, Narciso LG, Lima VM, et al.

2.3.5 Não ultrapassar a citação de 40 referências.

Exemplos de referências:

#### Livro

Preedy VR, organizer. Fluorine: chemistry, analysis, function and effects. London: Royal Society of Chemistry; 2015.

#### Capítulo de Livro

Buzalaf CP, Leite AL, Buzalaf MA. Fluoride metabolism. In: Preedy VR, organizator. Fluorine: chemistry, analysis, function and effects. London: Royal Society of Chemistry; 2015. p. 54-72.

#### Artigo de periódico

Gordyus M, Nagas E, Terun OY, Gordyus O. A comparison of three rotary systems and hand instrumentation technique for the elimination of Enterococcus faecalis from the root canal. Aust Endod J. 2011;37(3):128-33.

#### Artigo de periódico exclusivamente na Internet (com identificador eletrônico)

Rudolph H, Ostertag S, Ostertag M, Walter MH, Luthardt KG, Kuhn K. Reliability of light microscopy and a computer-assisted replica measurement technique for evaluating the fit of dental copings. J Appl Oral Sci [Internet]. 2018[cited 2017 Dec 12];26:e20160590. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-7757-2016-0590>

#### Artigo de periódico com DOI

Wagner F, Strasz M, Traxler H, Schicho K, Seemann R. Evaluation of an experimental oblique plate for osteosynthesis of mandibular condyle fractures. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2017;124(6):537-41. doi: 10.1016/j.oooo.2017.09.004

#### Artigo de periódico Epub ahead of print/In press/Forthcoming

Nair R, Chiu SE, Chua YK, Dhillon IK, Li J, Yee RT. Should short-term use of alcohol containing mouthrinse be avoided for fear of worsening xerostomia? J Oral Rehabil. Forthcoming 2017. doi: 10.1111/joor.12587

#### Artigos com mais de 6 autores:

Citam-se até os 6 primeiros seguidos da expressão " et al."

Grubbs V, Plantinga LC, Crews DC, Bibbins-Domingo K, Saran R, Heung M, et al. Vulnerable populations and the association between periodontal and chronic kidney disease. Clin J Am Soc Nephrol. 2011;6:711-7

#### Volume com suplemento e/ou Número Especial

Davidson CL. Advances in glass-ionomer cements. J Appl Oral Sci. 2006;14(sp. Issue):3-9.

A exibição das referências é de responsabilidade dos autores.

### 3 PRINCÍPIOS ÉTICOS E REGISTROS DE ENSAIOS CLÍNICOS

**3.1 Procedimentos experimentais em animais e humanos.** O periódico Journal of Applied Oral Science endossa os princípios incorporados na Declaração de Helsinki e insiste que todas as pesquisas que envolvam seres humanos publicadas nesta Revista, sejam conduzidas em conformidade com esses princípios e com outros similares dispostos nos respectivos Comitês de Ética em Pesquisa das respectivas instituições de origem dos autores. No caso de experimentos com animais, estes devem seguir os mesmos princípios de ética envolvidos. Em experimentos que envolvam procedimentos cirúrgicos em animais, os autores devem descrever na seção de Material e Métodos evidências de que a dosagem anestésica produziu efeito adequado e por tempo necessário para a condução do ato cirúrgico. Todos os experimentos com humanos ou animais devem vir acompanhados de descrição, na seção de Material e Métodos, de que o estudo foi aprovado pelos respectivos órgãos que gerenciam a Ética em Pesquisa nas suas instituições de origem.

3.1.1 Artigos apresentando estudos experimentais em humanos ou animais deverão obrigatoriamente vir acompanhados de

### 3 PRINCÍPIOS ÉTICOS E REGISTROS DE ENSAIOS CLÍNICOS

**3.1 Procedimentos experimentais em animais e humanos.** O periódico Journal of Applied Oral Science endossa os princípios incorporados na Declaração de Helsinki e insiste que todas as pesquisas que envolvam seres humanos publicadas nesta Revista, sejam conduzidas em conformidade com esses princípios e com outros similares dispostos nos respectivos Comitês de Ética em Pesquisa das respectivas instituições de origem dos autores. No caso de experimentos com animais, estes devem seguir os mesmos princípios de ética envolvidos. Em experimentos que envolvam procedimentos cirúrgicos em animais, os autores devem descrever na seção de Material e Métodos evidências de que a dosagem anestésica produziu efeito adequado e por tempo necessário para a condução do ato cirúrgico. Todos os experimentos com humanos ou animais devem vir acompanhados de descrição, na seção de Material e Métodos, de que o estudo foi aprovado pelos respectivos órgãos que gerenciam a Ética em Pesquisa nas suas instituições de origem.

3.1.1 Artigos apresentando estudos experimentais em humanos ou animais deverão obrigatoriamente vir acompanhados de documento comprobatório da aprovação pelo Comitê de Ética.

3.1.2 Artigos apresentando estudos em animais deverão obrigatoriamente vir acompanhados de Checklist ARRIVE devidamente preenchido. O documento está disponível no link a seguir:

<https://mc04.manuscriptcentral.com/societivimages/jaos-scielo/ARRIVEChecklist.docx>

3.1.3 Relatórios emitidos em língua que não inglês, espanhol e português devem ser traduzidos para o inglês.

#### 3.2 Registros de Ensaios Clínicos

O periódico Journal of Applied Oral Science apóia as políticas para registro de ensaios clínicos da Organização Mundial da Saúde (OMS) e do Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas (ICMJE), reconhecendo a importância dessas iniciativas para o registro e divulgação internacional sobre estudos clínicos com acesso aberto. Sendo assim, somente serão aceitos para publicação os artigos de pesquisas clínicas que tenham o registro, em uma das plataformas de ensaios clínicos, validadas pelos critérios estabelecidos pela OMS e pelo ICMJE. A OMS define Ensaio Clínico como "qualquer estudo de pesquisa que prospectivamente designa participantes humanos ou grupos de humanos para uma ou mais intervenções relacionadas à saúde para avaliar os efeitos e os resultados de saúde. Intervenções incluem, mas não se restringem a drogas, células e outros produtos biológicos, procedimentos cirúrgicos, procedimentos radiológicos, dispositivos, tratamentos comportamentais, mudanças no processo de cuidado, cuidado preventivo etc."

3.2.1 Os artigos que envolvam ensaios clínicos (clinical trials) em voluntários humanos deverão ser enviados acompanhados de dois documentos suplementares obrigatórios:

- checklist do CONSORT 2010 (<http://www.consort-statement.org/>)
- comprovante de número de registro da pesquisa em base que atenda às exigências da Organização Mundial da Saúde (OMS) e do Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas (ICMJE).
- Sugestões para autores brasileiros: <http://www.ensaiosclinicos.gov.br/>
- Sugestão para autores brasileiros ou de outras nacionalidades: <http://www.controlled-trials.com/> (ISRCTN) ou <http://rsinfo.clinicaltrials.gov/>.

3.3 O Editor-Chefe e o Conselho Editorial se reservam o direito de recusar artigos que não demonstrem evidência clara de que esses princípios foram seguidos ou cujos métodos empregados forem considerados inapropriados para o uso de humanos ou animais.

### 4 OUTRAS QUESTÕES SERÃO RESOLVIDAS PELO EDITOR-CHEFE E CONSELHO EDITORIAL

- Sugestões para autores brasileiros: <http://www.ensaiosclinicos.gov.br/>
- Sugestão para autores brasileiros ou de outras nacionalidades: <http://www.controlled-trials.com/> (ISRCTN) ou <http://rsinfo.clinicaltrials.gov/>.

3.3 O Editor-Chefe e o Conselho Editorial se reservam o direito de recusar artigos que não demonstrem evidência clara de que esses princípios foram seguidos ou cujos métodos empregados forem considerados inapropriados para o uso de humanos ou animais.

### 4 OUTRAS QUESTÕES SERÃO RESOLVIDAS PELO EDITOR-CHEFE E CONSELHO EDITORIAL

## 1 SUBMISSÃO DO TRABALHO

1.1 Os manuscritos deverão ser submetidos por meio do endereço: <https://mc04.manuscriptcentral.com/jaos-scielo>

1.2 O arquivo original contendo o manuscrito deve ser submetido sem a identificação dos autores e afiliações. A folha de rosto deverá ser submetida como arquivo complementar (Title page) contendo o nome dos autores, afiliações e endereço para correspondência.

1.3 As figuras devem ser submetidas como arquivos suplementares de acordo com as especificações do item 2.1 sobre forma e preparação dos manuscritos.

1.4 As tabelas devem ser preparadas em formato Excel e devem ser submetidas como arquivos suplementares.

1.5 Documentos comprobatórios de registro de ensaios clínicos e de aprovação de relatórios por Comitê de Ética deverão ser submetidos como arquivos suplementares obrigatórios.

1.6 O comprovante de revisão da língua inglesa (termo de responsabilidade assinado ou comprovante emitido por empresa) deverá ser submetido como arquivo complementar obrigatório.

1.7 O formulário de submissão, assinado por TODOS os autores, deve ser submetido como arquivo complementar.

1.8 O Journal Applied Oral Science recomenda a inclusão do número de registro ORCID dos autores para submissão dos manuscritos. Todos os autores devem associar o número de registro no ORCID ao seu perfil no ScholarOne.

# ANEXO 3 – INSTRUÇÕES AOS AUTORES PARA SUBMISSÃO NO PERIÓDICO MYCOPATHOLOGIA

## Instructions for Authors

### MANUSCRIPT SUBMISSION

#### Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

#### Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

#### Online Submission

Please follow the hyperlink "Submit online" on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

### TITLE PAGE

[http://www.springer.com/life+sciences/microbiology/journal/11046?print\\_view=true&detailsPage=plfci\\_1890368](http://www.springer.com/life+sciences/microbiology/journal/11046?print_view=true&detailsPage=plfci_1890368)

1/16

#### Title Page

The title page should include:

- # The name(s) of the author(s)
- # A concise and informative title
- # The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- # The e-mail address, and telephone number(s) of the corresponding author
- # If available, the 16-digit ORCID of the author(s)

#### Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

#### Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

### TEXT

#### Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- # Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- # Use italics for emphasis.
- # Use the automatic page numbering function to number the pages.
- # Do not use field functions.
- # Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

### Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

### Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

## TEXT



### Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- LaTeX macro package (zip, 182 kB)

### Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

### Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- LaTeX macro package (zip, 182 kB)

### Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

### Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

### Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

### Acknowledgments

# APÊNDICE 1- CARTA DE ANUÊNCIA

## APÊNDICE 1 – CARTA DE ANUÊNCIA

Título do Projeto: **"PROJETO SAUDEARTE: Troca de saberes e difusão da cidadania"**.  
Pesquisadora Responsável: **Prof. Dr. Edetrudes de Oliveira Lima**.

### CARTA DE ANUÊNCIA

Pelo presente instrumento, Mário Cicera de Brito / CPF: 415.127.094-15 da comunidade Recanto de Pepe manifesta sua anuência em participar da realização do projeto **PROJETO SAUDEARTE: Troca de saberes e difusão da cidadania**, o qual será parte integrante da dissertação do mestrado em Odontologia pela Universidade Federal da Paraíba dos mestrandos Julliana Cariry Palhano e José Klinderberg de Oliveira Júnior. Esse trabalho tem como objetivo: propor, aplicar e conhecer a influência da arte no padrão de educação-saúde e qualidade de vida de indivíduos pertinentes as comunidades com e sem atividade cultural do município de João Pessoa-PB e/ou de outros, fomentando o desenvolvimento de atividades educativas e trocas de saberes entre profissionais liberais, estudantes da área de saúde da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e os integrantes das comunidades. Além de isolar, identificar leveduras do gênero *Candida* da cavidade bucal de indivíduos das comunidades incluídas nesse projeto e avaliar a atividade antifúngica *in vitro* de produtos naturais sobre as cepas clínicas isoladas.

A referida pesquisa tem como pesquisadora responsável a Prof.ª Dr.ª Edetrudes de Oliveira Lima. Telefone: (83) 98787-3357 e e-mail: edelolima@yahoo.com.br.

Os dados coletados e registrados ficarão à disposição das Instituições e responsáveis pela pesquisa, sempre respeitando o caráter confidencial das informações registradas e o sigilo de identificação dos participantes. Os dados serão arquivados pelos pesquisadores e, serão desativados após o período de cinco (5) anos.

Eu declaro ter pleno conhecimento da pesquisa e a aceitação está condicionada ao cumprimento dos pesquisadores aos requisitos da Resolução 466/2012 CNS/MS e suas complementares, comprometendo-se a utilizar os dados e materiais coletados exclusivamente para os fins de pesquisa, produção de trabalhos de divulgação e publicação científicas.

Caledeia, 14 de maio de 2016.

Instituição/Comunidade/Grupo: Comunidade Recanto de Pepe

Mário Cicera de Brito  
Responsável/Representante

## **APÊNDICE 2- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Título do Projeto: **“Identificação de espécies de *Candida* da cavidade oral de indivíduos usuários de prótese e sensibilidade *in vitro* a produtos naturais e/ou sintéticos”**

Pesquisador Responsável: José Klidenberg de Oliveira Júnior.

Orientador: Edeltrudes de Oliveira Lima.

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Prezado (a) Senhor (a)

Estamos realizando um estudo com o objetivo de identificar os microrganismos do gênero *Candida*, presente nos indivíduos moradores de três comunidades da grande João Pessoa, e avaliar a sensibilidade desses microrganismos frente a produtos naturais utilizados em uma nas referidas comunidades da cidade de João Pessoa-PB. Esta pesquisa se justifica pela necessidade de terapia alternativa no tratamento de infecções por *Candida* na cavidade oral devido a inconvenientes encontrados nos produtos alopáticos como alto custo, ineficiência de alguns produtos sintéticos e agressividade ao organismo humano. Espera-se que, a partir dos resultados deste estudo, haja o aumento do interesse pelo desenvolvimento de produtos naturais com potencial aplicabilidade clínica, visando criar novas estratégias de controle químico das infecções da cavidade oral por *Candida*, bem como suprir os inconvenientes e fragilidades dos produtos do mercado. Participarão da pesquisa indivíduos moradores das referidas comunidades que tenha idade superior a 18 anos e aceitaram participar da pesquisa. As informações serão coletadas por meio de formulários de pesquisa e coleta de material biológico da prótese e da boca do participante. Informamos que esta pesquisa oferece riscos mínimos a seus participantes, como constrangimento. Não possui nenhum meio de discriminação aos autores dos documentos envolvidos no estudo. Sua participação é voluntária, sendo garantido o direito de desistir da pesquisa, em qualquer tempo, sem que essa decisão o prejudique quanto aos aspectos éticos, morais, financeiros, sociais e de acesso à saúde. Todas as informações obtidas em relação a esse estudo permanecerão em sigilo, assegurando proteção de sua imagem e dos autores dos documentos envolvidos no estudo. Serão respeitados valores morais, culturais, religiosos, sociais e éticos. Os resultados dessa pesquisa poderão ser apresentados em congressos ou publicações científicas, porém sua identidade não será divulgada nestas apresentações, nem serão utilizadas quaisquer imagens ou informações que permitam a sua identificação. Esperando contar com o seu apoio, desde já agradecemos a sua colaboração.

Contato com o pesquisador responsável:

Caso necessite de maiores informações sobre o presente estudo, favor ligar para a pesquisadora José Klidenberg de Oliveira Júnior. Telefone: (83) 9 9 99925634, Endereço: Rua Joaquim Pires Ferreira, Bairro dos Estados. João Pessoa – PB. CEP: 58030229. E-mail: joseklidemberg@gmail.com

Contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do CCS/UFPB

**Endereço: Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba - 1º andar / Campus I / Cidade Universitária / CEP: 58.030-224. Telefone: (83) 3216 7791. E-mail: eticaccsufpb@hotmail.com**

AUTORIZAÇÃO

Após ter sido informado sobre a finalidade da pesquisa "**Identificação de espécies de Candida da cavidade oral de indivíduos usuários de prótese e sensibilidade in vitro a produtos naturais e/ou sintéticos**", **AUTORIZO** a utilização dos dados por mim fornecidos.

João Pessoa, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2014.

---

Assinatura do voluntário da pesquisa

---

Assinatura da Pesquisadora Responsável  
(José Klidenberg de Oliveira Júnior)

Impressão Datiloscópica



---

Assinatura da Orientadora da Pesquisa  
(Edeltrudes de Oliveira Lima)

## Apêndice 3 – Formulário –A Formulário de auto avaliação da saúde bucal adaptado de Pinheiro et al., 2005

### 1. Dados pessoais

Comunidade: \_\_\_\_\_

Data de Nascimento: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_ Raça: \_\_\_\_\_

Naturalidade: \_\_\_\_\_ Profissão: \_\_\_\_\_

### 2- Dados socioeconômicos

#### Grau de escolaridade

Ensino Fundamental Incompleto ( ) Ensino Fundamental Completo ( )  
Ensino Médio Incompleto ( ) Ensino Médio Completo ( ) Ensino Superior ( )

#### Renda Familiar

1 salário mínimo ( ) Menos de 1 salário mínimo ( ) Mais de 1 salário mínimo ( )  
Entre 1 e 2 salários mínimos ( ) 2 ou mais salários mínimos ( )

### 3- Como classificaria sua saúde bucal?

Péssima( ) Ruim( ) Regular( ) Boa( ) Ótima( ) Não sabe( )

### 4-Você alguma vez já recebeu orientação do seu dentista sobre saúde bucal?

( ) Sim ( ) Não

### 5- Você tem ou já teve algum problema com seus dentes, boca ou prótese dentária que interferem ou já interferiram na sua alimentação?

Muito frequente ( ) Pouco frequente ( ) Ocasionalmente ( ) Quase nunca ( ) Nunca ( )

### 6- Você tem algum problema com seus dentes?

( ) Sim ( ) Não

### 7- Você tem algum problema com suas gengivas?

( ) Sim ( ) Não

### 8 – Você tem sofrido dores na sua boca (dentes, gengiva, bochecha ou língua)?

Muito frequente ( ) Pouco frequente ( ) Ocasionalmente ( ) Quase nunca ( ) Nunca ( )

### 9- Quando você ou algum parente sente algum incômodo na boca, vocês costumam procurar ajuda de alguém?

( ) Sim Quem? \_\_\_\_\_  
( ) Não

**Faz ou já fez uso, alguma vez, de plantas para curar doenças da boca**

( ) Sim Quais? \_\_\_\_\_ Para que fins? \_\_\_\_\_  
( ) Não

**10- Você se sente inibido por causa de seus dentes, boca ou prótese dentária?**

Muito ( ) Pouco frequente ( ) Ocasionalmente ( ) Quase nunca ( ) Nunca ( )

**11-Com que frequência você escova os dentes?**

Nunca escovei os dentes ( ) Não escovo todos os dias( )  
1 vez por dia( ) 2 vezes ou mais por dia ( )

**12-O que você usa para fazer a higiene de sua boca?**

Escova de dente? ( ) sim ( ) não  
Pasta de dente? ( ) sim ( ) não  
Fio dental? ( ) sim ( ) não

**13- Faz o uso de algum tipo de planta para higienizar a boca:**

( ) Sim Qual? \_\_\_\_\_  
( ) Não

**14- Você tem uma escova de dente só sua?**

( ) Sim, tenho uma somente para mim  
( ) Não, compartilho minha escova com outra(s) pessoa(s)

**15-Com que frequência você troca a sua escova de dente por uma nova?**

( ) Com menos de 3 meses ( ) Entre 3 meses e menos de 6 meses  
( ) Entre 6 meses e menos de 1 ano ( ) Com mais de um ano ( ) Nunca trocou

**16- Quando você consultou um dentista pela última vez?**

Há menos de 1 ano( ) Entre 1 ano e menos de 2 anos( )  
Entre 2 anos e menos de 3 anos ( ) 3 anos ou mais( ) Nunca consultou( )

**17- Qual o principal motivo da sua última consulta?**

Revisão, manutenção ou prevenção ( ) Dor de dente( ) Extração( )  
Tratamento dentário ( ) Problema na gengiva( ) Tratamento de ferida na boca( )

**18- Onde foi à consulta?**

( ) Unidade de saúde pública (posto de saúde ou unidade de saúde da família)  
( ) CEO (Centro de Especialidade Odontológica)  
( ) Hospital Público  
( ) Consultório particular ou consultório de estabelecimento privado ou ambulatório de empresa ou sindicato

**19- Você usa algum tipo de prótese dentária?**

Não ( )  
Sim, para substituir um dente ( )  
Sim, para substituição de mais de um dente ( )

Sim, prótese dentária total (dentadura) em cima ( )

Sim, prótese dentária total (dentadura) em baixo ( )

Sim, próteses dentárias totais (dentaduras) em cima e em baixo ( )

**EXAME MICOLÓGICO**  
**Laboratório de Micologia**

**EXAME MICOLÓGICO**

**Usuário:**

**Nº Exame:** 01

**Material Biológico:** Esfregaço da mucosa jugal, palato e língua

**Data:**

**EXAME MICROSCÓPICO DIRETO:**

(X) A fresco      ( ) KOH      ( ) Ziehl      ( ) Tinta Nanquim      ( ) Gram

**Resultado:** Leveduras

**CULTURA:**

( ) Ágar Sabouraud    ( ) Mycosel Agar    ( ) Ágar Níger    ( ) Ágar Dixon    (X) ChromAGAR  
com antibiótico

**Resultado:** *Candida albicans*

**OBSERVAÇÃO:**

---

---

---

**Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima**  
Profª Associada / DCF  
Mat. SIAPE: 333921

---

**José Klidenberg de Oliveira Júnior**  
Mestrando em Ciências Odontológicas CCS / UFPB  
Mat.: 2016100154