

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

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO CINAMALDEÍDO,
 α -TERPINEOL E PRÓPOLIS VERMELHA FRENTE À
BIOFILMES DE *Candida spp.***

Loyse Martorano Fernandes

SAPIENTIA AEDIFICAT

2017

LOYSE MARTORANO FERNANDES

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO CINAMALDEÍDO, α -TERPINEOL E
PRÓPOLIS VERMELHA FRENTE À BIOFILMES DE *Candida spp.***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dra. Leopoldina de Fátima Dantas de Almeida

Co-orientador: Prof. Dr. Yuri Wanderley Cavalcanti

João Pessoa

2017

Catálogo na publicação Seção de

F363a Fernandes, Loyse Martorano.

Atividade antifúngica do cinamaldeído, a-terpineol e própolis vermelha frente à biofilmes de *Candida* spp. / Loyse Martorano Fernandes. - João Pessoa, 2018.

67 f. : il.

Orientação: Leopoldina de Fátima de Dantas de Almeida.

Coorientação: Yuri Wanderley Cavalcanti.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Biofilmes. 2. *Candida*. 3. Controle da infecção. I.

Almeida, Leopoldina de Fátima de Dantas de. II.

Cavalcanti, Yuri Wanderley. III. Título.

UFPB/BC

Catálogo e Classificação

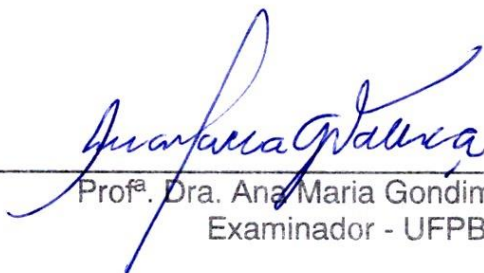
LOYSE MARTORANO FERNANDES

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO CINAMALDEÍDO, A-TERPINEOL E
PRÓPOLIS VERMELHA FRENTE À BIOFILMES DE *CANDIDA*
SPP

Banca Examinadora



Prof. Dr. Leopoldina de Fátima Dantas de Almeida
Orientadora



Prof.ª Dra. Ana Maria Gondim Valença
Examinador - UFPB



Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka
Examinador Externo

Dedico este trabalho a minha avó Haydee Martorano da Silva, que com seus 93 anos de vida, ainda esbanja coragem e garra para enfrentar os desafios diários. Com ela aprendi o valor incomensurável que a educação pode proporcionar às pessoas e a certeza que todo esforço, por menor que seja, será recompensado.

AGRADECIMENTOS

Escolha: esta é a palavra que define com exatidão o sentimento vivido durante esses dois anos de mestrado. Fazer pós-graduação *stricto sensu*, por inúmeros motivos, não foi uma escolha fácil, mas sem dúvidas foi a decisão que me proporcionou uma realização profissional, que certamente não teria em outro segmento. Por isso, se hoje comemoro essa conquista, devo àqueles que trilharam comigo esse caminho, participando e compartilhando da construção desse sonho sob a proteção de Deus. Para tanto, agradeço:

Aos meus pais Sônia e Fernando, minha eterna gratidão pela dedicação e esforços investidos em mim, sempre incentivando a incessante busca dos meus objetivos. Com eles pude aprender a importância da honestidade e do caráter, além da busca pelo conhecimento como uma mola que nos propulsiona diariamente. Agradeço também as incontáveis vezes que deixaram suas particularidades em segundo plano e investiram na minha educação, a custo de muito suor e dedicação, bem como pela compreensão nos momentos de ausência, necessários para esta dissertação, enfim, se tornar possível.

Sem dúvida, os obstáculos ao longo desta jornada foram árduos, muitas vezes difíceis de serem superados, a custo de muito empenho. Entretanto, o apoio e torcida dos meus familiares se tornaram essenciais ao longo deste processo, cujos gestos rotineiros foram o incentivo do meu desejo em vencer. Em especial, não posso deixar de agradecer aqueles que estiveram presentes de maneira ímpar: meus irmãos Cássius e Vinícius, minha Tia Cleide e minha prima Karla.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e ao seu Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO), além do Laboratório de Microbiologia Oral do Núcleo de Medicina Tropical, Laboratório de Cultivo e Análise Celular e o Laboratório de Biomateriais, meu especial agradecimento à oportunidade de contribuir com o meu aprendizado, oferecendo todo o suporte e infraestrutura necessária para a construção desta pesquisa.

Nesse sentido, estendo meus agradecimentos ao Grupo de Pesquisa em Odontopediatria e Clínica Integrada (GPOCI), por ter me proporcionado uma das melhores experiências acadêmicas que pude vivenciar, onde aprendi a

importância de se trabalhar em equipe, estabelecer metas e seguir metodologias que produzam uma ciência de exímia qualidade, e principalmente, com a relevância necessária para subsidiar práticas clínicas na odontologia. Dessa forma, sou imensamente grata aos companheiros do GPOCI e aos Professores Ana Maria, Wilton Padilha, Bianca Santiago, Yuri Cavalcanti e Leopoldina Almeida por todas as experiências compartilhadas.

Ao Professor André Ulisses e a amiga Patrícia Lopes, obrigada por todo incentivo e apoio dado para que eu pudesse ingressar no PPGO da UFPB. Como mencionado anteriormente, as decisões fazem parte do processo, e sem dúvidas, essas pessoas foram fundamentais para a realização dessa escolha. Acima de tudo me aconselharam em um momento de incerteza e me fizeram achar o caminho que me faz realizada hoje.

À minha orientadora Prof. Leopoldina, que me cobra quando necessário e se preocupa com meu futuro e minhas escolhas, além de incentivar, torcer e se orgulhar das minhas conquistas e vitórias. Saiba que és para mim exemplo de determinação, superação, organização e educação. Carrego comigo essas virtudes que te fazem uma grande orientadora e professora, além da amizade que construímos. Não tenho palavras para agradecer sua paciência em me ensinar, repassando todos os conhecimentos possíveis, principalmente nos momentos em que tive dificuldade.

Ao meu coorientador, Prof. Yuri, que considero também meu orientador, não somente neste trabalho de dissertação, como durante todas as produções científicas desenvolvidas no mestrado. És responsável por tantos ensinamentos, principalmente disposição e incansável busca pelo conhecimento, que me fizeram evoluir substancialmente ao longo desses dois anos. Acima de tudo, levarei a amizade para quaisquer caminhos que trilhar.

Aos meus amigos, Rênnis, Mariana Marinho, Jannerson, Raphael, Tainá, Natanael, Elza, Ilky, Karla, Larissa, Johnys, Mariana Barbosa, Olívia e Carol, agradeço pela compreensão e pelo apoio incondicional para que eu pudesse manter o foco no real objetivo. Muito obrigada por serem minha segunda família e meu escape nos momentos de angústia e preocupações, me ouvindo e acreditando no meu potencial. Guardo cada um com muito apreço em meu coração, e espero poder compartilhar e comemorar ainda com vocês os momentos mais marcantes que venham a ocorrer em minha vida.

RESUMO

Infecções por *Candida spp* são prevalentes na cavidade bucal, sendo indicado o uso de fármacos como a nistatina, fluconazol, miconazol. Em infecções específicas como a periimplantite, recomenda-se o uso de bochechos com clorexidina. Entretanto, são observados efeitos adversos e, por isso, estudos recentes buscam alternativas terapêuticas baseadas em produtos de origem natural. Objetivou-se avaliar o efeito inibitório do cinamaldeído, α -terpineol e própolis vermelha frente à biofilmes de *Candida spp*. No primeiro estudo, avaliou-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do α -terpineol e cinamaldeído, utilizando-se a técnica da microdiluição seriada, frente a cepas padrão de *C. albicans* (ATCC 90028), *C. glabrata* (2001) e *C. krusei* (ATCC 34135), além de isolados clínicos de *C. albicans*. Verificou-se que a CIM para o α -terpeniol variou de 312,5 μ g/mL a 40 μ g/mL e a do cinamaldeído de 78 μ g/mL a 20 μ g/mL, ambos a depender da cepa testada. Em um segundo estudo, avaliou-se o efeito do cinamaldeído 0,4% e da própolis vermelha 3% em biofilmes uniespécie e multiespécie desenvolvidos sobre superfícies de titânio, onde foram analisadas a atividade metabólica (MTT), viabilidade celular (UFC/mL) e a rugosidade superficial (perfilometria óptica). Nos dois primeiros ensaios os dados foram analisados por ANOVA complementada por Tukey ($\alpha=5\%$), em seguida da perfilometria analisada descritivamente. Clorexidina a 0,12% e solução salina a 0,9% foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente. A própolis vermelha reduziu em 72% o número de células viáveis em comparação ao grupo controle positivo no biofilme uniespécie ($p<0,05$). Em relação à atividade metabólica, o grupo da própolis vermelha reduziu 81% e 74% ($p<0,05$), os biofilmes uniespécie e multiespécie, respectivamente. Portanto, conclui-se que o cinamaldeído, o α -terpineol e a própolis vermelha apresentam efeito inibitório frente a cepas de *Candida spp*, embora o cinamaldeído não tenha demonstrado atividade satisfatória em biofilmes desenvolvidos sobre superfícies de titânio. Diferindo da própolis vermelha, que se mostrou uma alternativa para o tratamento da peri-implantite.

Palavras-chave: Biofilmes, *Candida*, Controle da infecção.

ABSTRACT

Candida spp infections are prevalent in the oral cavity, being indicated the use of drugs such as nystatin, fluconazole, miconazole. In specific infections such as peri-implantitis, the use of mouthwashes with chlorhexidine is recommended. However, adverse effects are observed and, therefore, recent studies seek therapeutic alternatives based on products of natural origin. The objective of this study was to evaluate the inhibitory effect of cinnamaldehyde, α -terpineol and red propolis on biofilms of *Candida spp*. In the first study, the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of the α -terpineol and cinnamaldehyde were evaluated, using the serial microdilution technique against standard strains of *C. albicans* (ATCC 90028), *C. glabrata* (2001) and *C. krusei* (ATCC 34135), in addition to clinical isolates of *C. albicans*. The MIC for α -terpenol was found to range from 312.5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ to 40 $\mu\text{g} / \text{ml}$ and cinnamaldehyde from 78 $\mu\text{g} / \text{ml}$ to 20 $\mu\text{g} / \text{ml}$, both depending on the strain tested. In a second study, the effect of 0.4% cinnamaldehyde and 3% red propolis on unisex and multispecies biofilms developed on titanium surfaces was evaluated. The metabolic activity (MTT), cell viability (CFU / mL) and surface roughness (optical profilometry). In the first two trials the data were analyzed by ANOVA complemented by Tukey ($\alpha = 5\%$), after the profilometry analyzed descriptively. 0.12% chlorhexidine and 0.9% saline solution were used as positive and negative controls, respectively. Red propolis reduced the number of viable cells by 72% compared to the positive control group in the unicorn biofilm ($p < 0.05$). In relation to metabolic activity, the red propolis group reduced 81% and 74% ($p < 0.05$), the uniespecies and multispecies biofilms, respectively. Therefore, it is concluded that cinnamaldehyde, α -terpineol and red propolis present an inhibitory effect against *Candida spp* strains, although cinnamaldehyde has not demonstrated satisfactory activity in biofilms developed on titanium surfaces. Differing from the red propolis, which proved to be an alternative for the treatment of peri-implantitis.

Key words: Biofilms, *Candida*, Control of infection.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(w/v): Weight per volume *traduzido como* peso por volume

3D: Tridimensional bidimensional *traduzido como* dimensão tridimensional

AIDS: Acquired Immunodeficiency Syndrome *traduzido como* Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ATCC: American Type Culture Collection

CAAE: Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

CFU/mL: Colony forming units per milliliter *traduzido como* Unidades Formadoras de Colônia por mililitro

GC: Growth control *traduzido como* grupo controle

CHX: Chlorhexidine *traduzido como* clorexidina

Cin: Cinnamaldehyde *traduzido como* cinamaldeído

Eap1: Purative cell wall adhesine *traduzido como* aderência de parede celular purativa

ERK MAPK: extracellular-regulated kinase *traduzido como* cinase extracellular regulada

HIV: Human Immunodeficiency Virus *traduzido como* vírus da imunodeficiência adquirida

Hwp1: Hyphal wall protein *traduzido como* proteína da parede de hifa

Hwp2: Hyphal wall protein 2 *traduzido como* proteína da parede de hifa 2

IL-1B: Interleucina 1 beta

IL-8: Interleucina 8

MIC: Minimum inhibitory concentration *traduzido como* Concentração Inibitória Mínima

MTT: Atividade metabólica

NFK- β : Nuclear factor kappa B *traduzido como* fator nuclear kappa B

pH: Potencial Hidrogeniônico

Ra: Linear surface roughness *traduzido como* rugosidade linear de superfície

Rbt1: Repressed by tup 1 *traduzido como* reprimido por tup 1

RPE: Red propolis extract *traduzido como* extrato da própolis vermelha

Sa: Surface area roughness *traduzido como* rugosidade superficial

TTO: Tea Tree Oil *traduzido como* óleo da árvore do chá

LISTA DE FIGURAS

Fig.01: Cell viability of biofilms (UFC/mL). Some biofilms of *C. albicans* not submitted to solutions of decontamination of titanium surfaces were considered as control group. Columns represent averages and bars represent standard deviations (n = 12). Groups identified with the same letter do not differ statistically (Tukey, $p > 0.05$). GC: growth control; CHX: chlorhexidine; Cin: cinnamaldehyde; RPE: red propolis extract.

Fig.02: Cell viability of biofilms (UFC/mL). Multispecies biofilms of *C. albicans* and *C. glabrata* not submitted to decontamination solutions of titanium surfaces were considered as control group. Columns represent averages and bars represent standard deviations (n = 12). Groups identified with the same letter do not differ statistically (Tukey, $p > 0.05$). GC: growth control; CHX: chlorhexidine; Cin: cinnamaldehyde; RPE: red propolis extract.

Fig.03: Cell metabolism by the MTT assay. Some biofilms of *C. albicans* not submitted to solutions of decontamination of titanium surfaces were considered as control group. Columns represent averages and bars represent standard deviations (n = 12). Groups identified with the same letter do not differ statistically (Tukey, $p > 0.05$). GC: growth control; CHX: chlorhexidine; Cin: cinnamaldehyde; RPE: red propolis extract.

Fig.04: Cell metabolism by the MTT assay. Multispecies biofilms of *C. albicans* and *C. glabrata* not submitted to decontamination solutions of titanium surfaces were considered as control group. Columns represent averages and error bars represent standard deviations (n = 12). Groups identified with the same letter do not differ statistically (Tukey, $p > 0.05$). GC: growth control; CHX: chlorhexidine; Cin: cinnamaldehyde; RPE: red propolis extract.

Fig.05: 3D graphic representations showing different topographical patterns of specimens subjected to studied conditions. Representative areas of peaks and valleys represent the biofilm multispecies, in solution saline and cinnamaldehyde, and biofilm uniespecies in chlorhexidine and red propolis extract.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. CAPÍTULO 1	6
Resumo:.....	7
Abstract:	8
INTRODUÇÃO	9
MATERIAL E MÉTODOS	11
Considerações Éticas.....	11
Seleção das Substâncias	11
Microrganismos envolvidos.....	11
Concentração Inibitória Mínima (CIM): avaliação em cultura planctônica.....	11
RESULTADOS	Erro! Indicador não definido.
DISCUSSÃO	14
CONCLUSÃO	19
3. CAPÍTULO 2	23
Abstract:	25
INTRODUCTION.....	26
MATERIALS AND METHODS:.....	28
Preparation of Specimens.....	28
Development of unispecies and multispecies biofilms	28
Preparation of and Treatment with the test substances	28
Viable Cell Counts	29
Cell Metabolism Evaluation.....	29
Surface roughness Evaluation	29
Data Analysis	30
RESULTS	31
DISCUSSION.....	36
CONCLUSION	41
4. CONSIDERAÇÕES GERAIS	47
5. CONCLUSÃO.....	50
REFERÊNCIAS*	51
ANEXO.....	57

1 INTRODUÇÃO

Espécies de *Candida spp* são frequentemente encontradas em superfícies cutâneas e de mucosa, como por exemplo, a cavidade bucal (Peleg et al., 2010). No entanto nas situações em que haja um desequilíbrio da microbiota do hospedeiro, como imunossupressão ou má higiene oral, esses microrganismos passam do estado comensal para o patogênico, promovendo um processo inflamatório e infeccioso conhecido como candidíase (Gow et al., 2011).

Quando o tratamento não é estabelecido, ou é insuficiente, essas infecções podem se agravar a ponto de disseminar pela corrente sanguínea. Nesse contexto, as alterações do microambiente promovidas pelo processo inflamatório influenciam a formação de hifas, estrutura morfológica associada à virulência da levedura e invasão dos tecidos. Estas favorecem interações entre biofilmes mistos, que podem se proteger mutuamente contra uma resposta imune do hospedeiro ou ação de um agente antimicrobiano (Peleg et al., 2010).

A prevalência de *Candida spp.* na cavidade bucal de indivíduos saudáveis é de 40-60% (Samaranayake., 2009), podendo aumentar para 62-93% em pacientes infectados pelo vírus do HIV (Costa et al., 2006; Lourenço et al., 2017). Embora a *Candida albicans* seja o fungo mais prevalente, outras espécies como *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, e *Candida dubliniensis* também são observadas em indivíduos com candidíase bucal (Lourenço et al., 2017). Estes microrganismos estão em sinergismo com espécies bacterianas, incluindo *Staphylococcus spp* e *Streptococcus spp* (Harriott, Noverr., 2011).

As interações entre *Candida sp* e bactérias orais são descritas na literatura (Cavalcanti et al., 2016a; Cavalcanti et al. 2016b). Espécies como *Streptococcus oralis* e *Streptococcus sanguinis* promovem uma co-agregação com *C.albicans*, mediadas por receptores de polissacarídeos de superfície de células estreptocócicas e adesinas de polipeptídeos (Peleg et al., 2010). Essas espécies bacterianas são capazes de adsorver proteínas ricas em prolina da saliva, promovendo a adesão de *C.albicans*. Além disso, a co-adesão desse biofilme, é realizada a partir da ação de adesinas da superfície celular de *Candida*, tais como Hwp1 (Hyphal wall protein), Hwp2 (Hyphal wall protein 2),

Rbt1 (Repressed By Tup1), Eap1 (Putative cell wall adhesine), aumentando substancialmente a biomassa disponível (Cavalcanti et al., 2017).

A saliva desempenha um papel fundamental nesse processo, pois é responsável pela formação de uma película que irá auxiliar na adesão inicial do biofilme. Essa estrutura é formada por glicoproteínas e funciona como uma espécie de barreira no epitélio, impedindo que enzimas secretadas por bactérias e fungos promovam danos à mucosa (Cannon et al., 2017).

Além da presença na superfície da mucosa, o microrganismo *Candida albicans* é observado em outras patologias como a periodontite e peri-implantite (Janus et al., 2017; Mencio et al., 2017). Em relação à peri-implantite, a presença de um biofilme multiespécie e patogênico na região do *abutment* de implantes dentários proporciona condições favoráveis para o desenvolvimento dessa doença (Mencio et al., 2017).

Bactérias como *Streptococcus spp* (Cavalcanti et al., 2016b), *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* são frequentemente encontradas em regiões peri-implantares (Schwarz et al., 2015). Nesse sítio, esse biofilme aumenta substancialmente a virulência de espécies de *Candida* (Cavalcanti et al., 2016b). Essa co-infecção de *Candida* e bactérias nessas regiões pode agravar o estado de inflamação peri-implantar gerada pela presença de biofilme, aumentando-se o risco de um processo infeccioso mais danoso.

Regiões peri-implantares são caracterizadas como de difícil higienização, já que o tipo de conexão implante-*abutment* (parafusada ou cimentada) está relacionada com uma maior retenção do biofilme, aumentando o risco e a severidade de peri-implantite (Baj et al., 2017). Além disso, a higiene oral deficiente contribui para permanência de um biofilme espesso nestas áreas. Em conexões parafusadas, o sulco peri-implantar apresenta bactérias e espécies de *Candida spp* acima do limiar patogênico (Mencio et al., 2017). Assim, o biofilme nesses sítios promove um processo inflamatório restrito à região de gengiva livre, progredindo para a reabsorção óssea e desestabilização do implante. Por conseguinte, esse processo interfere no sucesso e longevidade das reabilitações com prótese sobre implante (Apatzidou et al., 2017).

De maneira geral, infecções por *Candida spp* são tratadas com antifúngicos como a nistatina e miconazol, utilizados de forma tópica. Já o fluconazol ou itraconazol, são agentes sistêmicos (Yan et al. 2016; Silva et al.

2017). No entanto, a ocorrência de resistência dos microrganismo a essas substâncias e seus efeitos colaterais, podem restringir sua aplicação. Constantes falhas nesse tipo de terapêutica são observadas, especialmente nos casos nos quais a higiene oral não é adequada, o que torna o tratamento longo e ineficaz (Pina et al., 2017). Além disso, nos casos de infecção localizada, como na peri-implantite, o uso de medicamentos sistêmicos é restrito, sendo recomendada a remoção químico-mecânica do biofilme e o uso de soluções antimicrobianas com efeito local.

Nos casos de peri-implantite, a desagregação do biofilme maduro em torno da região peri-implantar é o tratamento padrão (Wohlfahrt et al., 2017). Para isso, são relatadas terapias não-cirúrgicas, como o desbridamento mecânico com jatos de ar abrasivos, aplicação de laser, ultrassom e o uso de agentes químicos como os antimicrobianos (Wiedmer et al., 2017; Javed et al., 2016). Entretanto, nenhum desses tratamentos de forma isolada foi suficiente para controlar o processo infeccioso (Htet et al., 2016).

A solução de clorexidina a 0,12% é considerada o padrão ouro para o tratamento químico da peri-implantite (John et al., 2017), devido a características próprias como substantividade e seu largo espectro de ação. No entanto, reações adversas, como lesões descamativas na mucosa, perda de paladar e xerostomia são frequentemente observadas quando a terapêutica é por um período maior que dez dias, o que torna o tratamento limitado (Menezes et al., 2016; da Costa et al., 2017).

Assim, atualmente novas substâncias químicas com ação antimicrobiana tem sido buscadas, com o objetivo de diminuir o crescimento do biofilme, com menor efeito adverso ao indivíduo do que as soluções químicas já existentes (Freires et al., 2016). De maneira geral, alguns estudos avaliaram os efeitos antimicrobianos de substâncias de origem natural, como óleos essenciais, extratos e moléculas bioativas, como os fitoconstituintes. Um possível mecanismo de ação dessas substâncias encontra-se na capacidade de romper a membrana celular dos microrganismos, gerando perda de enzimas e nutrientes, e consequentemente, morte celular (Ferreira et al., 2015; das Neves et al., 2016; Almeida et al., 2016).

Nesse sentido, atualmente pesquisas focam no uso do extrato da própolis vermelha como alternativa aos produtos já existentes (Dantas Silva et al., 2017;

do Nascimento et al., 2016). Esse extrato é caracterizado como uma substância resinosa agregada a seiva floral, secreções salivares de abelhas, cera e pólen, sendo apontada como um composto que possui atividade anti-tumoral, anti-oxidativa e antimicrobiana, sendo estes efeitos propiciados por flavanóides (Sawaya et al., 2002).

Já os fitoconstituintes são moléculas bioativas puras, e por isso, substâncias como o cinamaldeído e α -terpineol, por exemplo, também tem sido estudadas quanto a sua atividade antimicrobiana (Khan et al., 2017; Sharifi-Rad et al., 2017). O cinamaldeído está presente na casca da canela (*Cinnamomum cassia*) e atua desorganizando a permeabilidade da membrana citoplasmática, inibindo o crescimento dos microrganismos. Segundo estudos, tem se demonstrado um agente antimicrobiano promissor para o tratamento de infecções tanto de origem bacteriana, quanto fúngica (Tagushi et al., 2013; Tagushi et al., 2012).

O α -terpineol está presente em produtos de origem natural como o eucalipto (*Eucalyptus cinérea*), a salvia (*Salvia libanotica*) e a árvore do chá (*Melaleuca alternifolia*), atuando de forma semelhante ao cinamaldeído, possuindo também atividade imunomoduladora (Sharifi-Rad et al., 2017). Sua atividade antimicrobiana é atribuída à presença de grupos funcionais, como álcoois, e à solubilidade do componente em membranas biológicas, proporcionando a lise celular (Carson et al., 2006).

Apesar dessas substâncias apresentarem características desejáveis para o hospedeiro, alguns estudos demonstram que produtos de origem natural podem apresentar algum grau de citotoxicidade á células humanas (Taha, Eldahshan. 2017; Talei, Mohammadi, Bahmani, Kopaei. 2017; Oyemitan et al. 2017; Waller et al. 2016), e por isso, o seu uso deve ser ponderado quanto à concentração utilizada. Além disso, um maior risco de citotoxicidade moderada pode ser atribuído a alguns componentes marjoritários específicos, como os fitoconstituintes (Basholli-Saliu et al., 2017).

Embora o efeito antimicrobiano dessas substâncias seja conhecido e relatado em estudos prévios (Shreaz et al., 2012; Taguchi et al., 2013; Dantas Silva et al., 2017; Sawaya et al., 2002; Oldoni et al. 2011; Silva et al. 2013; Nogueira et al., 2014; Ramage et al., 2012), sua ação frente a um biofilme multiespécie em regiões peri-implantares é pouco explorado. Por isso, esse

estudo tem como objetivo avaliar *in vitro* o efeito inibitório do cinamaldeído, terpineol e própolis vermelha em biofilmes multiespécies.

CAPÍTULO 1

O manuscrito a seguir intitulado **“Cinamaldeído e α -terpineol inibem crescimento de culturas planctônicas de *Candida albicans* e não albicans”** foi submetido para publicação no periódico “Revista Brasileira de Plantas Medicinais” - Qualis B2, ISSN 1516-0572 e encontra-se em análise.

Cinamaldeído e α -terpineol inibem crescimento de culturas planctônicas de *Candida albicans* e não albicans

Fernandes LM¹; Rodrigues NC²; Cavalcanti YW³; Almeida LFD³.

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária CEP: 58051-900, João Pessoa-Brasil.

²Graduação em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária CEP: 58051-900, João Pessoa-Brasil.

³Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária CEP: 58051-900, João Pessoa-Brasil. Departamento de Clínica e Odontologia Social. Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária CEP: 58051-900, João Pessoa-Brasil.

Resumo:

A candidíase oral é uma infecção oportunista causada por leveduras do gênero *Candida*. Fármacos como nistatina, fluconazol e miconazol são empregados no tratamento, entretanto os microrganismos podem se tornar resistentes a estas substâncias, desta forma novos agentes vêm sendo pesquisados. Assim, objetivou-se avaliar o efeito antifúngico do cinamaldeído e α -terpineol, em culturas planctônicas de *C. albicans* (ATCC 90028), *C. glabrata* (ATCC 2001) e *C. krusei* (ATCC 34135). Foram utilizadas cepas de referência de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e quatro isolados clínicos. Após a preparação do inóculo (1×10^3 UFC/mL), 100 μ L da diluição inicial de cada fitoconstituente foi inserida e realizada a técnica de microdiluição seriada utilizando meio RPMI 1640. Nistatina 100.000UI foi utilizada como controle positivo. Verificou-se que a CIM para o terpeniol variou de 312,5 μ g/mL a 40 μ g/mL e a do cinamaldeído de 78 μ g/mL a 20 μ g/mL, ambos a depender da cepa avaliada. Portanto, conclui-se que os fitoconstituintes cinamaldeído e α -terpineol apresentam efeito inibitório frente culturas planctônicas de *Candida albicans* e não albicans. Diante das concentrações inibitórias mínimas encontradas neste estudo, o cinamaldeído apresentou atividade antifúngica em menores concentrações.

Palavras-chaves: Candidíase, *Candida albicans*, Fitoterapia.

Abstract:

Oral candidiasis is an opportunistic infection caused by yeasts of the genus *Candida*. Drugs such as nystatin, fluconazole and miconazole are used in treatment, however, microorganisms may become resistant to these substances, in this way new agents have been investigated. The aim of this study was to evaluate the antifungal effect of cinnamaldehyde and α -terpineol in planktonic cultures of *C. albicans* (ATCC 90028), *C. glabrata* (ATCC 2001) and *C. krusei* (ATCC 34135). Reference strains of *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* and four clinical isolates were used. After preparation of the inoculum (1×10^3 CFU/mL), 100 μ L of the initial dilution of each phytoconstituent was inserted and the serial microdilution technique was performed using RPMI 1640. Nistatina 100,000 IU was used as a positive control The MIC for terpenol was varied from 312.5 μ g/mL to 40 μ g/mL and cinnamaldehyde from 78 μ g/mL to 20 μ g/mL. depending on the strain evaluated. Therefore, it is concluded that phytochemicals of cinnamaldehyde and α -terpineol have an inhibitory effect against planktonic cultures of *Candida albicans* and not albicans. In view of the minimal inhibitory concentrations found in this study, cinnamaldehyde showed antifungal activity at lower concentrations.

Key-words: Candidiasis, *Candida albicans*, Phytotherapy.

INTRODUÇÃO

A candidíase oral, infecção fúngica oportunista, representa uma doença prevalente em pacientes imunocomprometidos, diabéticos, submetidos a regime de drogas anti-retrovirais e ainda aqueles usuários de próteses dentárias, geralmente associada a uma condição de má higiene oral (WILLE et al., 2013; WILLIAMS et al., 2013). Em casos de candidose oral, a *Candida albicans* é a espécie dominante (ZOMORODIAN et al., 2011), entretanto, a presença de espécies não albicans favorecem a produção de matriz extra-celular, permitindo invasão epitelial (NASH et al., 2015). Este microambiente reflete clinicamente em uma reação inflamatória instalada e evolução da infecção.

A propedêutica para tratamento desta infecção oral requer o uso de antifúngicos tópicos ou sistêmicos. A escolha do agente deve considerar sítio da infecção, se apenas bucal ou orofaríngea (MAHBOUBI; BIDGOLI, 2010), bem como a condição sistêmica do paciente (PELEG; HOGAN; MYLONAKIS, 2010; RAJENDRAN et al., 2016; WILLE et al., 2013). Casos mais graves, geralmente em pacientes portadores de AIDS ou com déficit imunológico, devem ser tratados com urgência, já que existe a chance do aparecimento de infecção nosocomial, podendo levar o paciente a óbito (KABWE et al., 2016; LI et al., 2015).

Dentre os antifúngicos mais prescritos destacam-se a Nistatina, Miconazol e Fluconazol, podendo este último ser empregado de forma sistêmica. Frequentemente, os derivados azólicos podem produzir resistência em espécies não albicans, a exemplo da *C. glabrata* (GOMES et al., 2011). A nistatina é o medicamento de escolha para tratamento da candidíase, entretanto tem sido relatado que o uso indiscriminado pode favorecer o aparecimento de espécies resistentes (RAMAGE et al., 2012).

Considerando que a resistência aos antifúngicos comercialmente disponíveis é uma temática atual, torna-se interessante a busca de substâncias que possam atuar no controle da infecção. Desse modo, a investigação acerca da ação antimicrobiana de fitoconstituintes tem aumentado. Estes, diferente de óleos essenciais ou extratos hidroalcoólicos, representam a molécula bioativa, isolada, a partir destes produtos vegetais, podendo apresentar efeitos biológicos específicos.

Moléculas como o 4-terpineol, carvacrol e aldeído cinâmico são determinados como agentes antimicrobianos, frente a cepas como *C. albicans*, *C. glabrata* ou *E. coli* (CHAILLOT et al., 2015; YANG; CHAO; LIU, 2014). O efeito antifúngico de fitoconstituintes como citrônolol, α -terpineol e limoneno é, especialmente frente a espécies do gênero *Penicillium* (TAO; JIA; ZHOU, 2014). Assim, estas moléculas podem apresentar potencial bioatividade, de modo a serem promissoras no tratamento de várias patologias, sobretudo a candidíase oral. Deste modo, este estudo teve o objetivo de avaliar o efeito antifúngico do cinamaldeído e do α -terpineol, em culturas planctônicas de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei*.

MATERIAL E MÉTODOS

Considerações Éticas

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal da Paraíba e aprovado pelo protocolo CAAE 55844316.9.0000.5188. As cepas clínicas utilizadas foram isoladas da região palatina de pacientes portadores de estomatite protética e cedidas pelo Laboratório de Micologia da mesma instituição.

Seleção das Substâncias

O cinamaldeído e o α -Terpineol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foram utilizados no presente estudo. As especificações técnicas das substâncias estão inseridas no quadro 1. Como controle positivo utilizou-se solução de Nistatina 100.000UI (Neo Química, São Paulo, Brasil).

QUADRO 1: Fitoconstituintes selecionados para o ensaio de microdiluição.

Fitoconstituintes	Fórmula Molecular	Classificação Química	Peso Molecular	Densidade
Cinamaldeído	C ₉ H ₈ O	Aldeído	132.16 g/mol	1050 mg/mL
α -Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	Álcool	154.25 g/mol	950 mg/mL

Microrganismos envolvidos

Foram utilizadas cepas de referência de *C. albicans* (ATCC 90028), *C. albicans* (ATCC 60193), *C. glabrata* (ATCC 2001), *C. krusei* (ATCC 34135). Quatro isolados clínicos de *C. albicans* foram utilizados a partir da denominação S1 a S4. As espécies foram reativadas e expandidas em meio Agar Sabouraud Dextrose (ASD) (Difco, Detroit, USA) a 35°C, por 24 h.

Concentração Inibitória Mínima (CIM): avaliação em cultura planctônica

Após o período de expansão, três a cinco colônias de cada espécie foram coletadas e suspensas em 5 mL de caldo RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis,

MO, USA), e o ajuste realizado na densidade óptica de 0,1, a 600 nm, o que corresponde a aproximadamente 1×10^6 UFC/mL. Em seguida, este inóculo inicial foi diluído 1000×, a uma concentração de 1×10^3 UFC/mL, para posterior utilização em cultura planctônica.

Os fitoconstituintes foram preparados para o ensaio utilizando meio RPMI 1640, em 0,1% de Tween 80, seguida de agitação vigorosa. Por meio deste, uma solução de trabalho na concentração 40.000µg/mL foi formulada para cada fitoconstituínte, sendo as concentrações de ambas substâncias variadas entre 10.000µg/mL e 5µg/mL. Para a técnica da microdiluição, diluições seriadas na própria placa de 96 compartimentos foram realizadas em 1:2 (v/v). Por fim, 100µL do inóculo previamente preparado foram inseridos e o conjunto incubado a 37°C por 48 horas.

Placas de 96 compartimentos foram utilizadas para determinação da CIM das substâncias, tendo como referência a normatização M27-A3 do Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI), a qual descreve a técnica da microdiluição em meio RPMI 1640 (CLSI, 2008). Para isso, após a preparação do inóculo e diluição inicial, 100µL de meio RPMI 1640 foram dispensados em cada compartimento. Em seguida, 100µL da diluição inicial de cada fitoconstituínte foi inserida e realizadas as diluições seriadas.

Como controle positivo, utilizou-se a solução de Nistatina a 100.000 UI (Neo Química, São Paulo, Brasil), sendo realizados o controle de crescimento, sem adição de qualquer substância e o controle de esterilidade, no qual os compartimentos foram preenchidos apenas com meio de cultura. A CIM foi definida como a menor concentração das substâncias capaz de inibir o crescimento visível dos microrganismos avaliados, sendo o presente ensaio realizado em triplicata, sendo avaliado pelo método visual, constatando-se ausência de turbidez.

Os dados foram analisados descritivamente, sendo a medida de moda considerada para determinação do valor da CIM de cada substância frente cada um dos microrganismos avaliados.

RESULTADOS

Verificou-se que a concentração inibitória mínima do α -terpineol variou entre 312,5 μ g/mL a 40 μ g/mL a depender da cepa avaliada (Tabela 1). Destaca-se que a espécie *C. krusei* foi a menos resistente aos efeitos do α -terpineol; enquanto que a maior concentração encontrada foi para *C. albicans* (90028) e *C. glabrata* (2001). Quanto às cepas de isolados clínicos, observou-se que apenas uma delas teve uma CIM de 78 μ g/mL, no lugar de 156 μ g/mL.

TABELA 1: Valores correspondentes a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do α -Terpineol e Cinamaldeído frente aos microrganismos avaliados.

Microrganismos	CIM	
	α -Terpineol	Cinamaldeído
<i>C. albicans</i> (ATCC 90028)	312,5 μ g/mL	40 μ g/mL
<i>C. albicans</i> (ATCC 60193)	156 μ g/mL	40 μ g/mL
<i>C. glabrata</i> (ATCC 2001)	312,5 μ g/mL	40 μ g/mL
<i>C. krusei</i> (ATCC 34135)	40 μ g/mL	20 μ g/mL
<i>C. albicans</i> S1	156 μ g/mL	78 μ g/mL
<i>C. albicans</i> S2	156 μ g/mL	40 μ g/mL
<i>C. albicans</i> S3	156 μ g/mL	40 μ g/mL
<i>C. albicans</i> S4	78 μ g/mL	20 μ g/mL

Os achados para a CIM do cinamaldeído determinaram menores valores tanto para *C. krusei* (ATCC 34135) como para *C. albicans* S4. O maior valor de concentração encontrado foi para a cepa clínica *C. albicans* S1, sendo 78 μ g/mL. A nistatina, utilizada como controle positivo, determinou atividade em todas as diluições seriadas avaliadas (dados não apresentados).

DISCUSSÃO

Embora a propedêutica medicamentosa para o tratamento da candidíase oral inclua medicamentos padrões, a exemplo da nistatina e miconazol, a obtenção de novas moléculas bioativas que possam atuar no tratamento da infecção tem sido destaque na literatura (FERRO et al., 2016; MARCOS-ARIAS et al., 2011; TAGUCHI et al., 2013). A minimização da resistência antimicrobiana associada a um possível efeito bioativo norteiam as pesquisas na área. No presente estudo, os fitoconstituintes testados apresentaram efeito antimicrobiano significativo, dadas as concentrações de CIM observadas.

Alguns fitoconstituintes tem ganhado destaque em estudos de atividade antimicrobiana frente a patógenos como *C. albicans*, *E. faecalis* e *E. coli* (HASSAN et al., 2010; MAPFUNDE; SITHOLE; MUKANGANYAMA, 2016; TAGUCHI et al., 2010, 2012). Dentre estes destaca-se o cinamaldeído o qual é o fitoconstituente majoritário presente no óleo extraído da casca da espécie *Cinnamomum cassia* (TAGUCHI et al., 2013).

Já o α -terpineol é um álcool monoterpeneo, extraído de diversas espécies como *Eucalyptus cinérea* (FRANCO, NAKASHIMA, FRANCO, 2005), *Salvia libanotica* (HASSAN et al., 2010) e *Melaleuca alternifolia* (NOGUEIRA et al., 2014). Ambos podem atuar na inibição de leveduras ou espécies bacterianas (FERRO et al., 2016; TAGUCHI et al., 2012; WALLER et al., 2016).

Considerando-se a CIM de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ e 2,0 $\mu\text{g/mL}$ encontrada previamente para nistatina e fluconazol frente amostra de *C. albicans* ATCC 90028 (DA SILVA et al., 2012), os resultados do presente estudo demonstram que a CIM obtida para cinamaldeído é 10× a 20× maior. Esse resultado é promissor, visto que o fitoconstituente apresenta eficácia comparável a uma molécula sintética já disponível comercialmente.

Especialmente o cinamaldeído é descrito como supressor da divisão celular bacteriana, podendo atingir também a permeabilidade da membrana citoplasmática (TAGUCHI et al., 2013) e assim promover o rompimento da integridade celular. Taguchi et al (2012) avaliaram o efeito do cinamaldeído frente a uma cepa clínica de *C. albicans*, variando temperatura de cultivo e tempo de exposição ao fitoconstituente. Determinaram que a 37°C o IC 50 após 60 min de contato variou entre 128-320 $\mu\text{g/mL}$.

Estes dados apresentam diferenças quanto aos do presente estudo, já que frente a amostras clínicas e padrão de *C. albicans* a CIM detectada foi de 40 µg/mL. Embora a concentração relatada para o estudo de Taguchi et al (2012) tenha sido superior, destaca-se que o mesmo avaliou o efeito sobre maior densidade celular e período de adesão inicial de 3 h, podendo estes parâmetros terem influenciado os resultados do estudo citado em comparação ao achados por este estudo.

O mesmo grupo de autores, em outro estudo, determinaram que a concentração de 40 µg/mL, foi capaz de inibir o crescimento fúngico de *C. albicans* após 24 horas em contato com as células (TAGUCHI et al., 2012). Desta forma, destaca-se que os resultados do presente estudo corroboram com Taguchi et al., (2013), considerando-se o resultado semelhante observado para as espécies padronizadas de *C. albicans* e *C. glabrata* e duas das cepas clínicas. Além disto, uma única cepa foi inibida com uma concentração superior, podendo sugerir-se que a avaliação frente a isolados clínicos pode representar um desafio maior ao efeito antifúngico esperado, já que há uma modificação fenotípica das células que dificultam a ação dos agentes antimicrobianos (KRZYSCIANK et al., 2017).

Os valores da CIM encontrados neste estudo estão abaixo dos apontados para a eficácia clínica de um antimicrobiano (>400 µg /mL) (GONZALEZ et al., 2013), embora seja relatado que *in vitro* substâncias com concentrações menores que 100 µg /mL são consideradas excelentes para esta atividade (HOLETZ et al., 2002). Dessa forma, de acordo com os resultados encontrados neste estudo, sugere-se que o uso de α -terpineol e do cinamaldeído seja eficaz clinicamente frente a todas as cepas avaliadas.

O efeito do cinamaldeído frente a culturas bacterianas, como *E. faecalis* (ATCC 19443) e *S. aureus* (ATCC 25923), tem sido averiguado. A CIM do cinamaldeído variou entre 0,5 e 0,25 µg /mL, para *E. faecalis* (ATCC 19443) e *S. aureus* (ATCC 25923), além de isolados clínicos destas espécies (FERRO et al., 2016). Assim, mesmo considerando-se a virulência e patogenicidade das espécies bacterianas, constata-se que as concentrações frente a espécies fúngicas foram inferiores pelo fato da diferença entre a concentração celular inicial e modelo de cultivo do estudo anterior.

Embora a infecção fúngica represente uma interação entre espécies, notadamente a mais prevalente é a *C. albicans* (ZOMORODIAN et al., 2011), sendo esta incluída em ensaios antifúngicos (ALMEIDA et al., 2012; DE ALMEIDA et al., 2016; FAOT et al., 2014). Desta forma, pouco se relata sobre o efeito de fitoconstituintes frente a espécies não albicans. O presente estudo, contudo, confirma a capacidade inibitória tanto do α -terpineol quanto do cinamaldeído, em baixas concentrações frente a cepas *C. glabrata* e *C. krusei*.

Estudos apontam que a *Candida krusei* produz amônia extracelular (NH₃), que favorece o aumento do pH circundante, capacidade tampão dentro as células e síntese de ATPase (JORGENSEN et al., 2017). Assim, a *C. krusei* apresenta um maior desafio para as substâncias em debelar infecções orais, visto que há uma resistência intrínseca, especialmente aos antimicrobianos disponíveis comercialmente (DIAS et al., 2017). Neste estudo, tanto do α -terpineol quanto do cinamaldeído foram capazes de inibir o crescimento de *C. krusei* em baixas concentrações, sugerindo que o mecanismos de ação dessas substâncias seja distinto ao dos componentes azólicos, devido à sua composição química, a qual possivelmente atua inibindo os fatores que modulam a resistência.

A atuação do cinamaldeído como agente fungistático seria ao nível da produção de farnesol, álcool responsável pela transformação da levedura em hifa (TAGUCHI et al., 2013), principal estrutura de virulência. Entretanto, apesar de resultados promissores, pouco se sabe sobre os efeitos citotóxicos desta molécula e se a mesma é capaz de promover bioestimulação celular, favorecendo o reparo do tecido afetado pela infecção fúngica. Já o α -terpineol apresenta propriedades antiinflamatórias (HASSAN et al., 2010), sendo conhecido por atuar na regulação de NFK- β em linhagens celulares tumorais como CCRF-CEM (leucemia), U937-GTB (linfoma) and NCI-H69 (pequenas células de cancer de pulmão) (HASSAN et al., 2010).

O α -terpineol, também avaliado pelo presente estudo, demonstrou atividade antifúngica variando entre 312,5 μ g/mL a 40 μ g/mL. A menor concentração encontrada foi determinada frente ao crescimento de *C. krusei*, demonstrando que a cepa avaliada frente a ambos os fitoconstituintes apresenta menor resistência. Já as amostras padrão e clínicas de *C. albicans* apresentaram valores de CIM superiores. Ramage et al (2012) determinaram o efeito

antibiofilme de compostos primários do *tea tree oil* (TTO), avaliando o efeito do α -terpineol frente a 100 cepas de *C. albicans*, incluindo amostras clínicas e padrão. Os autores observaram que uma concentração de 5 mg/mL foi suficiente para determinar 90% de morte celular em biofilmes uniespécie do microrganismo.

Entretanto, o estudo citado utiliza metodologia distinta, com concentração celular de 10^6 cels/mL, sendo esta característica para cultura de biofilmes. O presente ensaio avalia o efeito do cinamaldeído e α -terpineol em cultura planctônica (10^3 cels/mL), determinando que concentrações menores podem ser efetivas quando submetidos a avaliação em uma densidade celular inferior.

O efeito sobre a proliferação bacteriana do α -terpineol e 4-terpineol também foi verificado frente cepas como *S. mutans* (ATCC 25175) e *S. sanguinis* (ATCC 49295), com CIM de 1,5 e 0,75 mg/mL. Vale ressaltar que ambos microrganismos compõem o biofilme cariogênico, tendo o *S. mutans* a capacidade de sobreviver em ambiente com baixo pH. Já o *S. sanguinis* pode estar presente em sítios periodontais, podendo estar associado a *C. albicans*, em casos de peri-implantite (BÜRGERS et al., 2010).

O α -terpineol tem sido avaliado em relação ao seu potencial imunomodulador, considerando que o mesmo é capaz de modular a ativação de NF-K B and ERK MAPK, em cultura de macrófagos, em baixas concentrações como 28,8 μ g e 13,9 μ g/mL. Entretanto, salienta-se que os efeitos sobre a produção de IL-1B e IL-8 podem ser dependentes da concentração utilizada (NOGUEIRA et al., 2014).

Sugere-se que a atividade antimicrobiana do α -terpineol e 4-terpineol seja alcançada a partir da desestabilização da membrana celular, permitindo desequilíbrio osmótico (RAMAGE et al., 2012). Além disto, a capacidade anti-inflamatória destes compostos tem sido relatada (NOGUEIRA et al., 2014; RAMAGE et al., 2012).

Embora seja um estudo *in-vitro*, diante dos resultados obtidos, observa-se que ambas as substâncias tem potenciais efeitos antifúngicos, entretanto deve-se ponderar em relação aos possíveis efeitos citotóxicos frente a culturas celulares de mamíferos. Embora a ação antimicrobiana destas substâncias esteja sendo extensivamente investigada, não há mais dados referente a toxicidade em culturas celulares, considerando a exposição de linhagens como L929 ou fibroblastos gengivais humanos. De modo que estes estudos se tornam de

extrema importância, pois nortearão possíveis efeitos locais na mucosa oral, caso um possível tratamento medicamentoso seja realizado a partir da administração destes fitoconstituintes.

CONCLUSÃO

Os fitoconstituintes cinamaldeído e α -terpineol apresentam efeito inibitório frente culturas planctônicas de *Candida albicans* e não albicans. Diante das concentrações inibitórias mínimas encontradas neste estudo, o cinamaldeído parece apresentar maior eficácia em menores concentrações.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, L. DE F. D. et al. Efficacy of citronella and cinnamon essential oils on *Candida albicans* biofilms. **Acta odontologica Scandinavica**, v. 74, n. 5, p. 393–398, jul. 2016.

CHAILLOT, J. et al. The monoterpene carvacrol generates endoplasmic reticulum stress in the pathogenic fungus *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 8, p. 4584–4592, 2015.

DA SILVA, W. J. et al. Exopolysaccharide matrix of developed *Candida albicans* biofilms after exposure to antifungal agents. **Brazilian dental journal**, v. 23, n. 6, p. 716–22, 2012.

DIAS, I.J. et al. Antifungal activity of linalool in cases of *Candida* spp. isolated from individuals with oral candidiasis. **Braz J Biol.** 2017 Sep 28:0.

FAOT, F. et al. Efficacy of citric acid denture cleanser on the *Candida albicans* biofilm formed on poly(methyl methacrylate): effects on residual biofilm and recolonization process. **BMC oral health**, v. 14, p. 77, 23 jun. 2014.

FERRO, T. A. F. et al. Cinnamaldehyde Inhibits *Staphylococcus aureus* Virulence Factors and Protects against Infection in a *Galleria mellonella* Model. **Front Microbiol.** 2016 Dec 21;7:2052.

FRANCO, T. NAKASHIMA, L. FRANCO, C. B. Composição química e atividade antimicrobiana in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F. Mull. ex Benth., Myrtaceae, extraído em diferentes intervalos de tempo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 191–194, 2005.

GOMES, P. N. et al. Bioactivity and cellular structure of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms grown in the presence of fluconazole. **Archives of oral biology**, v. 56, n. 11, p. 1274–81, nov. 2011.

HASSAN, S. B. et al. Alpha terpineol: a potential anticancer agent which acts through suppressing NF-kappaB signalling. **Anticancer research**, v. 30, n. 6, p. 1911–9, jun. 2010.

HOLETZ, F.B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2002 Oct;97(7):1027-31.

JORGENSEN, M.R. et al. Probiotic *Lactobacillus reuteri* has antifungal effects on oral *Candida* species in vitro. **J Oral Microbiol.** 2017 Jan 18;9(1):1274582.

KABWE, M. et al. Etiology, Antibiotic Resistance and Risk Factors for Neonatal Sepsis in a Large Referral Center in Zambia. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 35, n. 7, p. e191-8, jul. 2016.

KRZYSCIĄK, W. et al. Effect of a Lactobacillus Salivarius Probiotic on a Double-Species Streptococcus Mutans and Candida Albicans Caries Biofilm. **Nutrients**. 2017 Nov 14;9(11).

MAPFUNDE, S.; SITHOLE, S.; MUKANGANYAMA, S. In vitro toxicity determination of antifungal constituents from Combretum zeyheri. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 16, p. 162, jun. 2016.

MARCOS-ARIAS, C. et al. In vitro activities of natural products against oral Candida isolates from denture wearers. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 11, p. 119, nov. 2011.

NASH, E. E. et al. Morphology-Independent Virulence of Candida Species during Polymicrobial Intra-abdominal Infections with Staphylococcus aureus. **Infection and immunity**, v. 84, n. 1, p. 90–8, 19 out. 2015.

NOGUEIRA, M. N. M. et al. Terpinen-4-ol and alpha-terpineol (tea tree oil components) inhibit the production of IL-1, IL-6 and IL-10 on human macrophages. **Inflammation Research**, v. 63, n. 9, p. 769–778, 2014.

PELEG, A. Y.; HOGAN, D. A.; MYLONAKIS, E. Medically important bacterial-fungal interactions. **Nature reviews. Microbiology**, v. 8, n. 5, p. 340–9, maio 2010.

RAJENDRAN, R. et al. Biofilm formation is a risk factor for mortality in patients with Candida albicans bloodstream infection-Scotland, 2012-2013. **Clin Microbiol Infect**. 2016 Jan;22(1):87-93..

RAMAGE, G. et al. Antifungal , cytotoxic , and immunomodulatory properties of tea tree oil and its derivative components : potential role in management of oral candidosis in cancer patients. **Front Microbiol**. 2012 Jun 18;3:220.

TAGUCHI, Y. et al. Therapeutic effects on murine oral candidiasis by oral administration of cassia (Cinnamomum cassia) preparation. **Japanese Journal of Medical Mycology**, v. 51, n. 1, p. 13–21, 2010.

TAGUCHI, Y. et al. Effect of cinnamaldehyde on hyphal growth of C. albicans under various treatment conditions. **Medical mycology journal**, v. 53, n. 3, p. 199–204, 2012.

TAGUCHI, Y. et al. The effect of cinnamaldehyde on the growth and the morphology of Candida albicans. **Medical Molecular Morphology**, v. 46, n. 1, p. 8–13, mar. 2013.

TAO, N.; JIA, L.; ZHOU, H. Anti-fungal activity of Citrus reticulata Blanco essential oil against Penicillium italicum and Penicillium digitatum. **Food chemistry**, v. 153, p. 265–71, 15 jun. 2014.

WALLER, Stefanie Bressan et al. Cytotoxicity and anti-Sporothrix brasiliensis activity of the Origanum majorana Linn. oil. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo , v. 47, n. 4, p. 896-901, Dec. 2016 .

WILLE, M. P. et al. Historical trends in the epidemiology of candidaemia: analysis of an 11-year period in a tertiary care hospital in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2013 May;108(3).

WILLIAMS, D. W. et al. Interactions of Candida albicans with host epithelial surfaces. **Journal of oral microbiology**, v. 5, 21 out. 2013.

YANG, T.-S.; CHAO, L. K.-P.; LIU, T.-T. Antimicrobial activity of the essential oil of Glossogyne tenuifolia against selected pathogens. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 14, p. 2965–2971, nov. 2014.

ZOMORODIAN, K. et al. Determination of antifungal susceptibility patterns among the clinical isolates of Candida species. **Journal of global infectious diseases**, v. 3, n. 4, p. 357–60, out. 2011.

3 CAPÍTULO 2

O manuscrito a seguir intitulado **“Inhibitory effect of cinnamaldehyde and red propolis on *Candida* biofilms developed on titanium surfaces”** foi submetido para publicação no periódico “Archives of Oral Biology” Qualis A2, ISSN 0003-9969 e encontra-se em “under editor evaluation”.

“Inhibitory effect of cinnamaldehyde and red propolis on *Candida* biofilms developed on titanium surfaces”

Loyse Martorano Fernandes¹, Yuri Wanderley Cavalcanti², Leopoldina de Fátima Dantas de Almeida^{*2}

¹ Postgraduate Program in Dentistry of Federal University of Paraíba. Cidade Universitária, s/n - Castelo Branco, João Pessoa, PB, Brazil. loyse_martorano@hotmail.com

²School of Dentistry, Federal University of Paraíba. Cidade Universitária, s/n - Castelo Branco, João Pessoa, PB, Brazil. yuri.wanderley@yahoo.com.br

² School of Dentistry, Federal University of Paraíba. Cidade Universitária, s/n - Castelo Branco, João Pessoa, PB, Brazil. leopoldinalmeida@hotmail.com

Prof^a Leopoldina de Fátima Dantas de Almeida (Corresponding author)

UFPB, Federal University of Paraíba

Cidade Universitária, João Pessoa, Paraíba, Brazil

e-mail:leopoldinalmeida@hotmail.com

Telephone: +55 (83) 3216 7797

Abstract:

Peri-implant inflammation resulting from the presence of *Candida* biofilms may compromise the longevity of implant-supported dental prostheses. This study evaluated the inhibitory effect of cinnamaldehyde and red propolis extract on unispecies biofilms of *C. albicans* (ATCC 90028) and multispecies biofilms of *C. albicans* (ATCC 90028) and *C. glabrata* (ATCC 2001), developed on titanium surfaces. Titanium specimens were pre-conditioned with artificial saliva and submitted to biofilm formation (1×10^6 CFU/mL). After initial adhesion (24h, 37°C under microaerophilic conditions), biofilms were submitted to treatment for 10 minutes, in groups: saline solution (growth control), 0.12% chlorhexidine, 0.4% cinnamaldehyde and 3% red propolis extract. Treatments were performed every 24h for 3 days and analyses were conducted at 96h after initial adhesion. The following were evaluated: metabolic activity (MTT assay, n=9/Group), cell viability (CFU counts, n=10/Group) and surface roughness (optical profilometry, n=2/Group). One-way analysis of variance complemented by Tukey test was performed at $\alpha=0.05$. In unispecies biofilm, chlorhexidine and red propolis groups demonstrated a reduction of 84% and 72% of cell viability, in comparison with the Control Group ($p<0.05$). In multispecies biofilm, chlorhexidine had the greatest effect reducing it by 77% ($p<0.05$). Relative to metabolic activity, the red propolis group also obtained a reduction of 81% and 74%, in unispecies and multispecies biofilms, respectively ($p<0.05$). In relation to surface roughness, red propolis and cinnamaldehyde showed results similar to those of growth control. Therefore, red propolis extract demonstrated potential antifungal activity against *Candida* biofilms, suggesting it to be a feasible alternative for the treatment of peri-implantitis.

Keywords: Biofilms, *Candida*, Peri-implantitis, Infection Control.

INTRODUCTION

Biofilm deposition on the coronal portion of osseointegrated implants and peri-implant tissues may result in an inflammatory reaction known as peri-implantitis. In addition to releasing by-products resulting from the metabolism of biofilm in an advanced stage of maturation, a history of periodontal disease associated with poor hygiene, alcohol and tobacco consumption and systemic conditions (i.e. diabetes) may favor the onset of the disease (Menezes et al., 2016).

Therefore, the main factor related to peri-implantitis is the presence of multispecies and pathogenic biofilm. Proteolytic microorganisms, such as *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* (Pérez-chaparro et al., 2016; Waal et al., 2016), saccharolytic bacteria, in example of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* (Bürgers et al., 2010) and fungi of the genus *Candida* are present in peri-implant sites (Canullo, Pennarocha-Oltra, Covani., 2015; Dabdoub et al., 2013). In this microenvironment it is difficult to perform hygiene and the microorganisms find a favorable environment to the establishment of multispecies communities, capable of releasing harmful toxins and by-products in the adjacent tissues.

In this context, approximately 30% of the microorganisms identified in peri-implant biofilm are fungi of the genus *Candida* (Schwarz et al., 2015). Besides that, peri-implant biofilms may became more pathogenic due to the presence of *Candida* species, which have increased virulence associated with plasmatic proteins and neutral pH from the crevicular fluid and blood exudate, increased carbon dioxide concentration and bacteria interaction with *Streptococcus* spp. (Cavalcanti et al., 2016).

Therefore, considering the heterogeneity of peri-implant biofilm and the expansion in the use of osseointegrated implants, peri-implantitis has become a frequent condition found in Dentistry (Lee, Huang, Zhu., 2017; Ramanauskaite & Juodzbaly., 2016). Based on that, biological failures related with biofilm accumulation are not tolerable. Implant-related failures have significant economic, biological and emotional impact (Lafaurie et al., 2017), which may impair developing strategies to avoid biofilm accumulation.. Therefore, some treatments

have been proposed (Ramanauskaite & Juodzbalsys., 2016; Amo et al., 2016; Karimi, Hasani., 2016).

Abrasive therapies with air, water, sodium bicarbonate or citric acid, plastic curettes scraping, ultrasonic cleansing (Ramanauskaite & Juodzbalsys., 2016.), antimicrobial photodynamic therapies (Karimi, Hasani., 2016), and topical antimicrobial agents have been studied (Amo et al., 2016). However, none of these methods used alone have obtained satisfactory results (Htet et al., 2016).

Antimicrobial mouthwash solutions are the most widespread and easy methods to apply, with emphasis on Chlorhexidine, considered the gold standard for the treatment of peri-implantitis (Kadkhoda, Amarlu, Eshraghi., 2016). Although its use is recommended, using the therapy for a prolonged period of time has adverse effects, such as desquamated lesions, teeth and mucosal staining, loss of taste and xerostomia (Menezes et al., 2016; Fernando et al., 2017).

Thus, the search for agents that present antimicrobial potential, however, with fewer side effects on the mucosa has been observed (Lacet et al., 2015). Bioactive molecules, capable of intervening in the adhesion and proliferation of microorganisms, and with lower cytotoxic effects on the mucosa are of great value in the treatment of peri-implantitis (Girardot & Imbert., 2016).

At present, cinnamaldehyde, molecule present in cinnamon bark, has been outstanding due to its antimicrobial action associated with cellular osmotic imbalance (Shreaz et al., 2016). Also outstanding have been the effect of red propolis extracts with antimicrobial and anti-oxidant action, proved by the flavonoids, such as kaempferol and rutin, contained in the composition of the extracts (do Nascimento et al., 2016). Thus, considering the need for new antimicrobial agents, this *in vitro* study evaluated the inhibitory effect of the phytoconstituent cinnamaldehyde and red propolis extract on unispecies biofilms of *C. albicans* (ATCC 90028) and multispecies biofilms of *C. albicans* (ATCC 90028) and *C. glabrata* (ATCC 2001), developed on titanium surfaces.

MATERIALS AND METHODS:

Preparation of Specimens

Commercially pure titanium specimens (1.3 x 1.3 x 0.2 cm) were prepared and polished in a barrel with abrasive paste and ceramic particles for 8 hours (Cavalcanti et al., 2016). Subsequently, they were cleaned in 70% alcohol (v/v) and sterilized by autoclave at 121°C for 15 minutes. Specimens were allocated into four different groups (n=12/group). At all stages of the study, the gold standard control was 0.12% chlorhexidine (Colgate-Palmolive, São Paulo, Brazil) and sterile saline solution - the growth control.

Development of unispecies and multispecies biofilms

Initially, salivary pellicle formation was induced by immersing specimens in artificial saliva (Laboratório Dilecta, João Pessoa, Brazil), composed of 1% carboxymethyl; 0.0084% sodium chloride; 0.12% potassium chloride; 0.0342% potassium phosphate; 0.0146% calcium chloride, and 0.052% magnesium chloride (Amaechi et al. 1999), and incubated at 37°C for 60 minutes. Afterwards, the specimens were transferred to 24-well plates.

Unispecies *C. albicans* (ATCC 90028) and multispecies de *C. albicans* (ATCC 90028) and *C. glabrata* (ATCC 2001) biofilms were obtained after incubating specimens in 500 µL of RPMI 1640 medium (Inlab diagnóstica, Brazil) containing approximately 1.0×10^6 cells/mL, according to the optic density of 0.1 under 600 nm (LGL Scientific 0741/16, Brazil). The system was incubated at 37°C, under microaerophilic conditions for 24 hours, with the purpose of simulating the atmosphere of micro-aerobiosis of the peri-implant environment.

Preparation of and Treatment with the test substances

The cinnamaldehyde (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and red propolis extract (Laboratory Edimel, Paraíba, Brazil) were prepared in sterile saline solution with 0.1% Tween 80, in the concentrations of 0.4% (w/v) and 3% (w/v), respectively, determined by pilot studies. Treatments were performed at 24 h, 48 h and 72 h from the start of biofilm formation. In each treatment episode, specimens

were immersed in tested substances and remained in contact with them for 10 minutes. After treatment, the samples were washed 2× with sterile saline solution and the culture medium was renewed, followed by incubation under microaerophilic conditions at 37°C. Analyses were made at the time interval of 96 h (4 days).

Viable Cell Counts

For cell viability analysis, the specimens were transferred to tubes containing 1.0 mL sterile saline solution, submitted to agitation in a vortex for 60 seconds, followed by serial dilution of the aliquots to determine the number of viable microorganisms (10^{-1} up to 10^{-6}).

Aliquots of 10 µl of each serial dilution were seeded in triplicate on Sabouraud dextrose agar plates (Merck KGaA, Germany). The plates were then incubated at 37°C for 48 h for later viable colony counts. The number of viable cells was counted and the values multiplied by the serial dilution. The data were expressed in colony forming unit per milliliter (CFU/mL).

Cell Metabolism Evaluation

Cell metabolism was analyzed by means of incubating the specimens in 600 µL RPMI medium containing 10% methyl-tetrazolium salt (MTT). The salt was oxidized by the SHD (succinate dehydrogenase) enzyme present in the respiratory chain of the biofilms, and then used to determine the viable cell metabolism. Specimens were incubated at 37°C for 3 hours in the presence of MTT salt and the system protected from the light. After this, the supernatant was removed and 600 µL isopropanol acid (6N-HCl) was inserted, followed by samples homogenization. The supernatant was collected and its absorbance analyzed under spectrophotometer at 570 nm (LGL Scientific 0741/16, Brazil).

Surface roughness Evaluation

The surface roughness of the biofilms developed on specimens' surface (n=2/group) was determined by means of profilometric analysis (CCI MP, Taylor Hobson, England). Initially, the biofilms were fixed in an aqueous solution of 2.5% glutaraldehyde, at 4°C for 24 h, and dehydrated at room temperature after being

submitted to increasing cycles of ethanol (50% to 100%). Surface roughness measurements (μm) were taken at two distinct points of the specimen, under 20 $\times$ magnification, considering the measurement standards xy (1024 $\times$ 1024 pixels), xyz (512 $\times$ 512 pixels) and z (256 $\times$ 256 pixels). The speed of 3 $\times$ was established, being the Ra and Sa parameters descriptively explored. Specimens without any biofilm on the surface were also evaluated and used as reference for the analysis of developed biofilms.

Data Analysis

The CFU/mL and absorbance values were evaluated as regards their normality and homocedasticity. Logarithmic transformation of viable cell counts was performed for statistical purposes. Statistical analysis was performed by means of one-way analysis of variance (1-way ANOVA) and Tukey tests ($\alpha=5\%$, power of 80%). Surface roughness analysis was determined descriptively.

RESULTS

Cell viability determined that both chlorhexidine and red propolis had inhibitory effects on the proliferation of unispecies biofilms, differing statistically from the growth control ($p < 0.05$). Cinnamaldehyde did not appear to interfere with the viability of *C. albicans*, since it did not statistically differ from the growth control ($p > 0.05$) (Fig. 01).

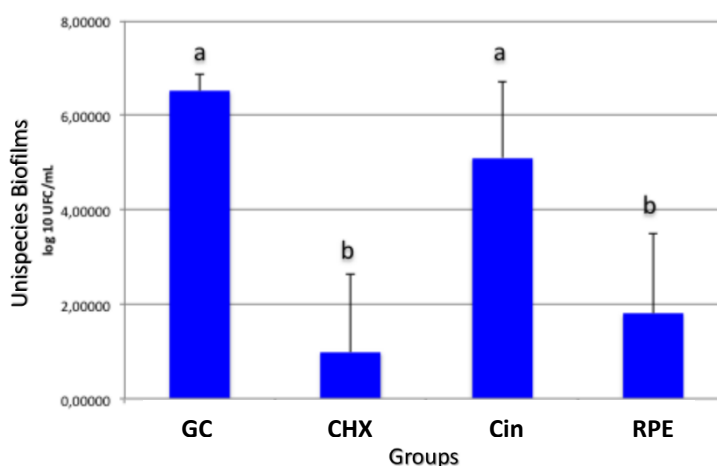


Fig.01: Cell viability of biofilms (UFC/mL). Some biofilms of *C. albicans* not submitted to solutions of decontamination of titanium surfaces were considered as control group. Columns represent averages and error bars represent standard deviations ($n = 12$). Groups identified with the same letter do not differ statistically (Tukey, $p > 0.05$). GC: growth control; CHX: chlorhexidine; Cin: cinnamaldehyde; RPE: red propolis extract.

However, for the multispecies biofilm samples, chlorhexidine had the highest inhibitory effect on these, differing from the other substances ($p < 0.05$). Red propolis differed statistically from the negative control and cinnamaldehyde ($p < 0.05$) with a lower effect than that of chlorhexidine (Fig. 02).

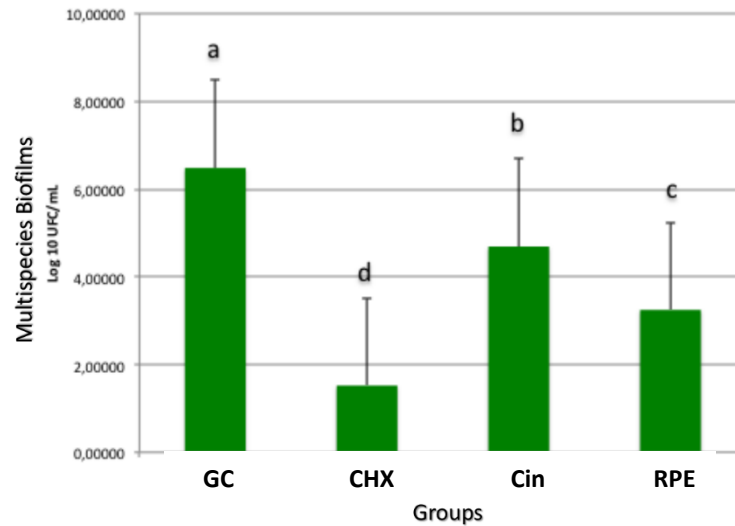


Fig.02: Cell viability of biofilms (UFC/mL). Multispecies biofilms of *C. albicans* and *C. glabrata* not submitted to decontamination solutions of titanium surfaces were considered as control group. Columns represent averages and error bars represent standard deviations (n = 12). Groups identified with the same letter do not differ statistically (Tukey, $p > 0.05$). GC: growth control; CHX: chlorhexidine; Cin: cinnamaldehyde; RPE: red propolis extract.

As regards the MTT assay, both chlorhexidine and red propolis reduced the metabolism of unispecies biofilms, differing statistically from the negative control and cinnamaldehyde ($p < 0.05$). Cinnamaldehyde reduced the metabolisms by 40%, statistically differing from the negative control ($p < 0.05$) (Fig. 03).

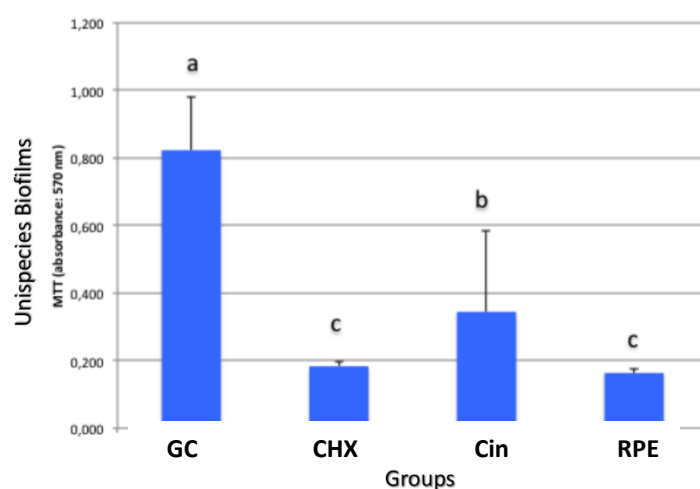


Fig.03: Cell metabolism by the MTT assay. Some biofilms of *C. albicans* not submitted to solutions of decontamination of titanium surfaces were considered as control group. Columns represent averages and error bars represent standard deviations (n = 12). Groups identified with the same letter do not differ statistically (Tukey, $p > 0.05$). GC: growth control; CHX: chlorhexidine; Cin: cinnamaldehyde; RPE: red propolis extract.

In the same way, the metabolism of multispecies biofilms were also reduced by the exposure to chlorhexidine and red propolis (Fig. 04), differing from the growth control group ($p < 0.05$). Cinnamaldehyde did not differ statistically from control group ($p > 0.05$).

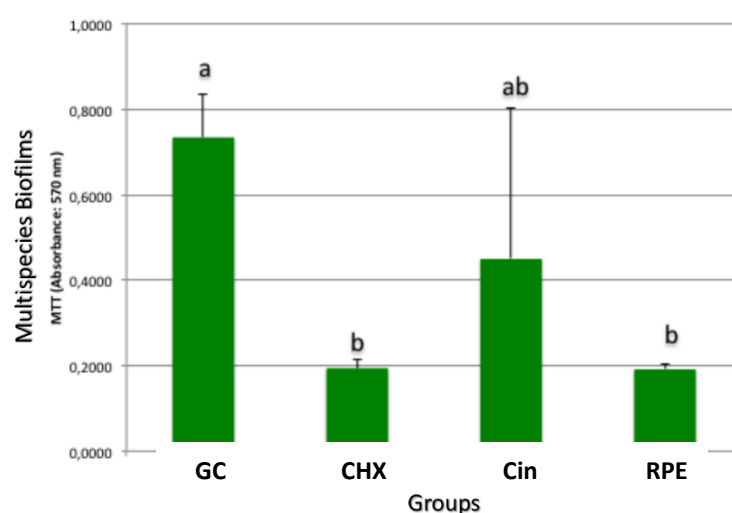


Fig.04: Cell metabolism by the MTT assay. Multispecies biofilms of *C. albicans* and *C. glabrata* not submitted to decontamination solutions of titanium surfaces were considered as control group. Columns represent averages and error bars represent standard deviations (n = 12). Groups identified with the same letter do not differ statistically (Tukey, $p > 0.05$). GC: growth control; CHX: chlorhexidine; Cin: cinnamaldehyde; RPE: red propolis extract.

The surface roughness parameters illustrated that all groups presented higher surface roughness values than that observed for specimens without biofilms. This confirms that all the groups have remnant biofilms. Figures 5, 6, 7 and 8 illustrated areas representative of peaks and valleys as result of the presence of biofilm.

Table 01: Average of the surface roughness (μm) parameters measured by 3D Optical Profiling in the samples submitted to the treatments by the substances.

Groups	Unispecies		Multispecies	
	Ra	Sa	Ra	Sa
Negative control	0,268	0,291	0,395	0,458
Chlorhexidine	0,174	0,204	0,182	0,229
Cinnamaldehyde	0,183	0,205	0,327	0,334
Red propolis extract	0,247	0,300	0,429	0,370
Specimens	0,129	0,185	0,129	0,185

Ra: Linear Surface Roughness; Sa: Surface Area Roughness

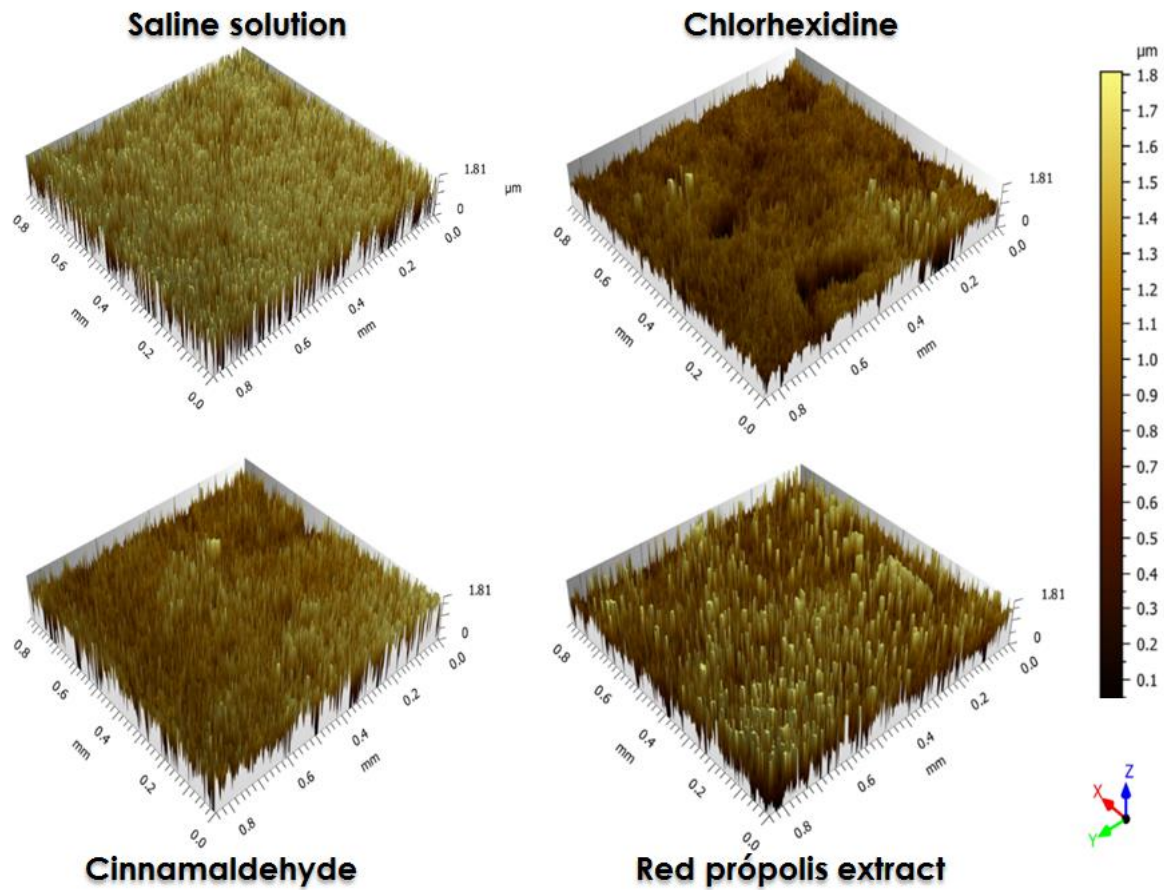


Fig.05: 3D graphic representations showing different topographical patterns of specimens subjected to studied conditions. Representative areas of peaks and valleys represent the biofilm multispecies, in solution saline and cinnamaldehyde, and biofilm uniespecies in chlorhexidine and red propolis extract.

DISCUSSION

Different treatment protocols for peri-implantitis have been studied, including chemical and mechanical intervention strategies (Karimi MR, Hasani A., 2016; Carcuac et al., 2015; Machtei et al., 2012). However, considering the complexity of peri-implant biofilm, the choice of the ideal antimicrobial agent must take into account its spectrum of action, without harming the host or causing resistance (Mousavi et al., 2016), as it is a difficult choice to make.

Due to its heterogeneity, reports have indicated that the *Candida* species are present in peri-implant biofilm. This opportunist microorganism may maintain itself and colonize the host in a latent manner, until conditions for its proliferation and consequent increase in pathogenicity are created. The virulence of *Candida* biofilms may increase under the variation of environmental conditions, such as the presence of crevicular exudate or in the presence of *Streptococcus spp* (Cavalcanti et al., 2016). Therefore, this study investigated the inhibitory effect of two substances on unispecies biofilms of *Candida albicans* and multispecies biofilms of *Candida albicans* and *Candida glabrata* developed on titanium surfaces, characterizing a clinical condition present in peri-implant biofilm retention sites.

The use of antimicrobial topical agents may be effective and well-disseminated to prevent biofilm accumulation, especially for regions that are difficult to clean such as peri-implant sites. The results of our study points out that, besides chlorhexidine-based mouthwash, emerging natural products in example of red propolis extract may be useful to the prevention of biofilm accumulation over dental implants and associated dentures.

Cinnamaldehyde and red propolis extract were selected according to pilot studies conducted with the minimum inhibitory concentration (MIC) obtained of each substance (unpublished data). Cinnamaldehyde is present in cinnamon husk or other specimens of the genus *Cinnamomum* such as camphor and cassia (Taguchi et al., 2013; Shreaz et al., 2016). The main difference between a phytoconstituent and a product of natural origin is the purity of the molecule. According to Almeida et al., 2016 the essential oil of cinnamon was capable of inhibiting the proliferation of *C. albicans* (ATCC 90028) biofilms on polymethylmethacrylate surfaces in the concentration of 1 mg/mL.

In the present study cinnamaldehyde did not differ from the growth control against unispecies biofilm, whereas for the multispecies biofilm the number of viable cells was reduced, without showing the same inhibitory activity as 0.12% chlorhexidine. Even though cinnamaldehyde was not the best alternative tested, it may have some efficacy compared to the absence of any treatment. Possibly greater antimicrobial activity may be observed in increased concentrations. According to the MIC assay (data not shown), this substance has a fungistatic profile and greater concentration may be needed to reduce biofilm formation.

It is worth emphasizing that the implementation of an antimicrobial therapy must modulate the cell proliferation, so that when it debilitates the infection, there must not be great damage to the subjacent tissue. Furthermore, one of the disadvantages of the use of chlorhexidine is its toxic potential to the mucosa, contra-indicating its use for prolonged periods (Menezes et al., 2016; Fernando et al., 2017).

In both types of biofilms, cinnamaldehyde showed not effective inhibitory activity. However, reports have indicated that, in bacterial and fungal species, this effect was due to the drop in ATPases production (Usta et al., 2003). Therefore it acts inhibiting the synthesis of the cell wall, promoting damage to the osmotic balance of the cell (Xie et al., 2004). Although this was not a finding of this study, the concentration used should be evaluated to find whether it is effective to promote the mechanism of action described.

Another possible factor with influence on the antimicrobial activity of cinnamaldehyde could be the temperature of exposure to biofilm. The incorporation of cinnamaldehyde into polyethylene-co-vinyl acetate pellicles at 37°C and 22°C, determined a lower antimicrobial effect against strains of *Escherichia coli* (ATCC 10536) and *Staphylococcus aureus* 815 (Nostro et al., 2015). The temperature of 37°C reflected a condition of cultivation that has been established in the literature (Kim et al., 2013), as it mimics the bodily conditions and is favorable to the proliferation of the microorganism. Perhaps temperature control is a variable that must be verified.

Relative to cell metabolism, evaluated by the MTT assay, the authors verified that cinnamaldehyde reduced the activity of SDH. However, the percentage of reduction in both types of biofilms was lower than that observed for the group exposed to 0.12% chlorhexidine and 3% red propolis extract. This

corroborates the results of cell viability, pointing out that the potential antimicrobial effect could be associated with the concentration of the phytoconstituent.

The 3% red propolis extract demonstrated an inhibitory effect on unispecies biofilm in a manner similar to that of chlorhexidine. Propolis is a natural resin produced by bees (Jovito et al., 2011), and has a varied chemical composition depending on the period and place of collection (Neto et al. 2017). Diverse formulations of propolis have been evaluated, as regards their antitumoral, anti-oxidative and antimicrobial activity, (Alencar et al., 2007), with these effects being favored by flavanoids present in the extracts (Sawaya et al., 2002). In addition, this extract may vary as to the vehicle used. In this study, the hydroalcoholic extract was used, since the alcoholic produces toxicity to the cells (Oyemitan et al., 2017).

Antimicrobial activity, in particular, has been determined against microorganisms such as *Staphylococcus*, *Actinomyces naeslundii* and gram-negative, such as *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium* (Alencar et al., 2007; Righi et al., 2011). Moreover, their inhibitory activity has been reported against planktonic cultures of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Staphylococcus aureus*, *Actinomyces naeslundii* (Oldoni et al., 2011; Bueno-silva et al., 2013).

We observed that the cell viability (CFU/mL) in unispecies biofilm was affected by exposure to the 3% (w/v) red propolis extract. However, against multispecies biofilms, the extract did not demonstrate the same efficacy. Perhaps, the potential effect of the red propolis extract would be superior in simpler biofilms with lower capacity for cell adhesion, extra cellular matrix formation and proliferation, with greater capacity for transporting the substance between the water channels and extracellular matrix.

Popular medicine has used propolis extract to treat throat infections and many commercial products are available nowadays varying their concentration from 10% to 30% (w/v). In the present study, we have used a concentration equivalent to 10× dilution of a 30% (w/v) commercial extract, which could be used to prepare a homemade mouthwash. Therefore, it should be considered that the effect evaluated in the present study concerns a diluted extract available commercially, or a possible dilution in the mouth after internal use (3× dilution of a 10% (w/v) product).

These findings corroborate those of authors who have demonstrated the inhibitory effect of this substance against species of *Candida spp* in patients with periodontitis (Siqueira et al., 2015; Lopez et al., 2015) in a multispecies biofilm of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermides*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Cryptococcus neoformans* (Siqueira et al., 2015). Although a promising substance has been demonstrated, a factor involved in the antimicrobial activity of red propolis is the period of collection.

This parameter may have an influence on the concentration of flavanoids such as quercetin, rutin and kaempferol, and could result in variations in its antimicrobial activity (Bueno-silva et al., 2013). However, there are no findings that could confirm the same results against species of *Candida spp*. Although clinical trials are necessary, this substance was shown to be an effective alternative for the treatment of infections by *Candida spp*.

The deleterious effect on cell metabolism in both types of biofilms was observed by the exposure to 3% red propolis extract in the same way as the standard antimicrobial substance. There have been reports in the literature that red propolis as well as green propolis extracts have potential anti-oxidant effects, depending on concentration (Machado et al., 2016). This effect could perhaps be observed in tissues subjacent to peri-implant biofilm. Therefore, the authors suggest the need for studies that evaluate the cytotoxic effects on human cells.

With regards to the surface roughness evaluation, our results demonstrated that on the titanium surfaces treated with cinnamaldehyde, the unispecies biofilm roughness showed results similar to those of chlorhexidine. In some ways, these results are promising, since they suggest that the biomass of biofilm remaining on the surface of the species were equivalent between the two treatments; although the number of viable microorganisms was lower for chlorhexidine. On the other hand, the roughness of multispecies biofilm treated with cinnamaldehyde presented results comparable with those of the gold-standard treatment. This aspect suggested lower efficacy of the treatments in the presence of multispecies when compared with unispecies biofilms.

The similarity between the surface roughness observed for biofilms treated with red propolis and chlorhexidine suggests that these treatments had equivalent efficacy. Stronger evidence of similar efficacy of red propolis and chlorhexidine is due to the reduction of cell viability and metabolic activity of biofilms.

The presence of remaining biofilms even after successive processes of cleaning with antimicrobial solutions is an aspect that has been observed by various studies (Almeida et al., 2016; Faot et al., 2014; Freitas-Fernandes et al., 2014). In this sense, the literature has demonstrated that chemical cleaning solution are not completely efficient in sterilizing surfaces, however, they contribute to reducing the microbial load. Under the conditions of the present study, the treatments proposed also appeared to demonstrate this effect, which shows a positive aspect because there is lower risk of causing biofilm imbalance *in vivo*, with proliferation of opportunist species. Therefore, we suggest that the daily cleaning protocols evaluated in the present manuscript contribute to the daily hygiene of individuals with osseointegrated implants.

Peri-implant biofilm was mimicked by cell adhesion to titanium surfaces, using a previously described methodology (Cavalcanti et al., 2016; Drago et al., 2016). In spite of being an *in vitro* model, the comparison between unispecies and mixed biofilms allowed the authors to evaluate potential chemical agent involved in treatment and prevention of peri-implantitis. Ideally, such agents may have diffusion capacity between the extracellular matrixes and have an antimicrobial effect against a larger number of cells. Both chlorhexidine and red propolis demonstrated these properties.

Future studies must consider an even more complex multispecies biofilm, with the involvement of other microbial species related to the etiology of peri-implantitis. However, the authors emphasize that, to evaluate the affect of antimicrobial agents, the composition of multispecies biofilms must consider the absence of antagonistic relations among the microorganisms. Therefore, under the conditions of the present study, the authors used a dual-species biofilm with proven synergistic behavior among species (Gomes et al., 2011). Evaluation of a mixed biofilm with antagonist species could generate a false impression of the efficacy of the antimicrobial solutions evaluated. Lastly, analysis of the toxicity of the substances is still necessary for making it feasible to design clinical studies.

CONCLUSION

Red propolis demonstrated potential antifungal activity against *Candida albicans* and *Candida glabrata*, suggesting it to be a feasible alternative for the treatment of peri-implantitis. However, it is necessary to conduct additional studies that could explore the biocompatibility and activity of this phytoconstituent *in situ*.

REFERENCES

- Alencar, S.M., Oldoni, T.L., Castro, M.L., Cabral, I.S., Costa-Neto, C.M., Cury, J.A., Rosalen, P.L., Ikegaki, M. (2007). Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis : Red propolis. *J Ethnopharmacol*, Sep 5;113(2):278-83.
- Almeida, L.F.D., Paula, J.F., Almeida, R.V., Williams, D.W., Hebling, J., Cavalcanti, Y.W. (2016). Efficacy of citronella and cinnamon essential oils on *Candida albicans* biofilms. *Acta Odontol Scand*, Jul;74(5):393-8.
- Amaechi, B.T., Higham, S.M., Edgar, W.M. (1999). Techniques for the production of dental eroded lesions in vitro, Feb;26(2):97-102.
- Bueno-Silva, B., Alencar, S.M., Koo, H., Ikegaki, M., Silva, G.V., Napimoga, M.H., Rosalen, P.L. (2013). Anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol isolated from Brazilian red propolis. *J Agric Food Chem*, May 15;61(19):4546-50.
- Bürgers, R., Hahnel, S., Reichert, T.E., Rosentritt, M., Behr, M., Gerlach, T., Handel, G., Gosau, M. (2010). Adhesion of *Candida albicans* to various dental implant surfaces and the influence of salivary pellicle proteins. *Acta Biomater*, Jun;6(6):2307-13.
- Canullo, L., Peñarrocha-Oltra, D., Covani, U., Rossetti, P.H. (2015). Microbiologic and Clinical Findings of Implants in Healthy Condition and with Peri-Implantitis. *Int J Oral Maxillofac Implants*, Jul-Aug;30(4):834-42.
- Carcuac, O., Derks, J., Charalampakis, G., Abrahamsson, I., Wennström, J., Berglundh, T. (2015). Adjunctive Systemic and Local Antimicrobial Therapy in the Surgical Treatment of Peri-implantitis : A Randomized Controlled Clinical Trial. *J Dent Res*. Jan;95(1):50-7.
- Cavalcanti, Y.W., Wilson, M., Lewis, M., Del-Bel-Cury, A.A., da Silva, W.J., Williams, D.W. (2016). Modulation of *Candida albicans* virulence by bacterial biofilms on titanium surfaces. *Biofouling*, Jan; 32(2):123-34, 7014.
- Costa, L.F.N.P., Amaral, C.D.S.F., Barbirato, D.D.S., Leão, A.T.T., Fogacci, M.F. Chlorhexidine mouthwash as an adjunct to mechanical therapy in chronic periodontitis: A meta-analysis. (2017). *J Am Dent Assoc*, May;148(5):308-318.
- Dabdoub, S.M., Tsigarida, A.A. & Kumar, P.S. (2013). Patient specific Analysis of Periodontal and Peri-implant Microbiomes. *J Dent Res*, Dec;92(12 Suppl):168S-

75S.

- Drago, L., Bortolin, M., De Vecchi, E., Agrappi, S., Weinstein, R.L., Mattina, R., Francetti, L. (2016). Antibiofilm activity of sandblasted and laser- modified titanium against microorganisms isolated from peri-implantitis lesions. *J Chemother*, Oct;28(5):383-9., 9478(May).
- Faot, F., Cavalcanti, Y.W., Mendonça, M.D., Pinto, L.R., da Silva, W.J., Cury, A.A. (2014). Efficacy of citric acid denture cleanser on the *Candida albicans* biofilm formed on poly(methyl methacrylate): effects on residual biofilm and recolonization process. *BMC Oral Health*, Jun 23;14:77.
- Freitas-Fernandes, F.S., Cavalcanti, Y.W., Ricomini Filho, A.P., Silva, W.J., Del Bel Cury, A.A, Bertolini, M.M. (2014). Effect of daily use of an enzymatic denture cleanser on *Candida albicans* biofilms formed on polyamide and poly (methyl methacrylate) resins : An in vitro study. *J Prosthet Dent*, Dec;112(6):1349-55.
- Girardot, M., Imbert, C. (2016). Natural Sources as Innovative Solutions Against Fungal Biofilms. *Adv Exp Med Biol*, 931:105-25.
- Gomes, P.N., da Silva, W.J., Pousa, C.C., Narvaes, E.A., Del Bel Cury, A.A. (2011). Bioactivity and cellular structure of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms grown in the presence of fluconazole. *Arch Oral Biol*, Nov;56(11):1274-81.
- Htet, M., Madi, M., Zakaria, O., Miyahara, T., Xin, W., Lin, Z., Aoki, K., Kasugai, S. (2016). Decontamination of Anodized Implant Surface With Different Modalities for Peri-Implantitis Treatment : Lasers and Mechanical Debridement With Citric Acid. *J Periodontol*. Aug;87(8):953-61.
- Jovito, V.C., Freires, I.A., Almeida, L.F.D., Moura, D., Castro, R.D., Paulo, M.Q., Leite-Cavalcanti, A. (2011). Activity of in vitro forms of dentifrices containing the hydroalcoholic extract of the ripe fruit of *Eugenia uniflora* L. (Surinam cherry) on cariogenic bacteria. *Acta Odontol Latinoam*, 24(1):41-6.
- Kadkhoda, Z., Amarlu, Z., Eshraghi, S., Samiei, N. (2016). Antimicrobial effect of chlorhexidine on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilms associated with peri-implantitis. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*, 10(3):176-80.
- Karimi, M. R., Hasani, A., & Khosroshahian, S. (2016). Efficacy of Antimicrobial Photodynamic Therapy as an Adjunctive to Mechanical Debridement in the Treatment of Peri-implant Diseases: A Randomized Controlled Clinical Trial, *Journal of Lasers in Medical Sciences*, 7(3), 139–145.
- Kim, N.C.B., Bo-Ram, B., Young, M.L., Sun-Young. (2013). Biofilm Formation,

Attachment, and Cell Hydrophobicity of Foodborne Pathogens under Varied Environmental Conditions. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 56, 207–220.

- Lacet, G.S.F., Pérez, A.L.A.L., Rocha, I.M., Pinheiro, M.A., Castro, R.D., Carlo, H.L., Lima, E.O., Castellano, L.R. (2015). Does Scientific Evidence for the Use of Natural Products in the Treatment of Oral Candidiasis Exist? A Systematic Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1, 107-116.

- Lafaurie, G.I., Sabogal, M.A., Castillo, D.M., Rincón, M.V., Gómez, L.A., Lesmes, Y.A., Chambrone, L. (2017). Microbiome and Microbial Biofilm Profiles of Peri-Implantitis : A Systematic Review. *J Periodontol*, Oct;88(10):1066-1089.

- Lee, C.T., Huang, Y.W., Zhu, L., Weltman, R. (2017). Prevalences of Peri-implantitis and Peri-Implant Mucositis: Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Dentistry*, Jul;62:1-12.

- Lopez, B.G., de Lourenço, C.C., Alves, D.A., Machado, D., Lancellotti, M., Sawaya, A.C. (2015). Antimicrobial and cytotoxic activity of red propolis : an alert for its safe use. *J Appl Microbiol*, Sep;119(3):677-87.

- Machado, C.S., Mokochinski, J.B., Lira, T. O., Oliveira, F.C.E., Cardoso, M.V., Ferreira, R.G., Sawaya, A.C.H.F., Ferreira, A.G., Pessoa, C., Cuesta-Rubio, O., Monteiro, M.C., Campos, M.S., Torres, Y.R. (2016). Comparative Study of Chemical Composition and Biological Activity of Yellow , Green , Brown , and Red Brazilian Propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1, 76-89.

- Machtei, E.E., Frankenthal, S., Levi, G., Elimelech, R., Shoshani, E., Rosenfeld, O., Tagger-Green, N., Shlomi, B. (2012). Treatment of peri-implantitis using multiple applications of chlorhexidine chips: a double-blind, randomized multi-centre clinical trial. *J Clin Periodontol*, Dec;39(12):1198-205.

- Menezes, K.M., Fernandes-Costa, A.N., Silva-Neto, R.D., Calderon, P.S., Gurgel, B.C. (2016). Efficacy of 0 . 12 % Chlorhexidine Gluconate for Non-Surgical Treatment of Peri-Implant Mucositis. *J Periodontol*, Nov;87(11):1305-1313.

- Mousavi, F., Bojko, B., Bessonneau, V., Pawliszyn, J. (2016). Cinnamaldehyde Characterization as an Antibacterial Agent toward E. coli Metabolic Profile Using 96-Blade Solid-Phase Microextraction Coupled to Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *J Proteome Res*, Mar 4;15(3):963-75.

- Nascimento, T.G., da Silva, P.F., Azevedo, L.F., da Rocha, L.G., de Moraes

- Porto, I.C., Lima, E., Moura, T.F., Basílio-Júnior, I.D., Grillo, L.A., Dornelas, C.B., Fonseca, E.J., de Jesus Oliveira, E., Zhang, A.T., Watson, D.G. (2016). Polymeric Nanoparticles of Brazilian Red Propolis Extract: Preparation, Characterization, Antioxidant and Leishmanicidal Activity. *Nanoscale Res Lett*, Dec;11(1):301.
- Neto, R.M.S., Tintino, S.R., da Silva, A.R.P., Costa, M.D.S., Boligon, A.A., Matias, E.F.F., de Queiroz Balbino, V., Menezes, I.R.A., Melo Coutinho, H.D. (2017). Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity , synergistic effect and phytochemical screening. *Food Chem Toxicol*, Sep;107:572-580.
- Neves, M.V., da Silva, T.M., Lima, E.O., da Cunha, E.V., Oliveira, E.J.V. (2015). Isoflavone formononetin from red propolis acts as a fungicide against *Candida* sp. *Braz J Microbiol*. 2016 Jan-Mar;47(1):159-66.
- Nostro, A., Scaffaro, R., Botta, L., Filocamo, A., Marino, A., Bisignano, G. (2015). Effect of temperature on the release of carvacrol and cinnamaldehyde incorporated into polymeric systems to control growth and biofilms of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Biofouling*. 2015;31(8):639-49.
- Oldoni, T.L.C., Cabral, I.S.R., Regitano d'Arce, M.A.B., Rosalen, P.L., Ikegaki, M., Nascimento, A.M., Alencar, S.M. (2011). Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. *Separation and Purification Technology*, 77(2), 208–213.
- Pérez-Chaparro, P.J., Duarte, P.M., Shibli, J.A., Montenegro, S., Lacerda Heluy, S., Figueiredo, L.C., Faveri, M., Feres, M. (2016). The Current Weight of Evidence of the Microbiological Profile Associated With Peri-Implantitis: A Systematic Review. *J Periodontol*. 2016 Nov;87(11):1295-1304., 1–16.
- Ramanauskaite, A., Juodzbalsys, G. (2016). Diagnostic Principles of Peri-Implantitis: a Systematic Review and Guidelines for Peri-Implantitis Diagnosis Proposal. *J Oral Maxillofac Res*. 2016 Sep 9;7(3):e8.
- Righi, A.A., Alves, T.R., Negri, G., Marques, L.M., Breyer, H., Salatino, A. (2011). Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. *J Sci Food Agric*, Oct;91(13):2363-70.
- Sawaya, A.C., Palma, A.M., Caetano, F.M., Marcucci, M.C., da Silva Cunha, I.B., Araujo, C.E., Shimizu, M.T. (2002). Comparative study of in vitro methods used to analyse the activity of propolis extracts with different compositions against species of *Candida*. *Lett Appl Microbiol*, 35(3):203-7.

- Schwarz, F., Becker, K., Rahn, S., Hegewald, A., Pfeffer, K., & Henrich, B. (2015). Real-time PCR analysis of fungal organisms and bacterial species at peri-implantitis sites. *International Journal of Implant Dentistry*, 1(1), 9.
- Siqueira, A.B., Rodriguez, L.R., Santos, R.K., Marinho, R.R., Abreu, S., Peixoto, R.F., Gurgel, B.C. (2015). Antifungal activity of propolis against *Candida* species isolated from cases of chronic periodontitis. *Braz Oral Res*, 29(1), pp.1–6.
- Suárez-López Del Amo, F., Yu, S.H., Wang, H.L. (2016). Non-Surgical Therapy for Peri-Implant Diseases : a Systematic Review. *Sep 9;7(3):e13, 7(3)*, pp.1–14.
- Taguchi, Y., Hasumi, Y., Abe, S., Nishiyama, Y. (2013). The effect of cinnamaldehyde on the growth and the morphology of *Candida albicans*. *Med Mol Morphol*. Mar;46(1):8-13.
- Usta, J., Kreydiyyeh, S., Barnabe, P., Bou-Moughlabay, Y., Nakkash-Chmairie, H. (2003). Comparative study on the effect of cinnamon and clove extracts and their main components on different types of ATPases. *Hum Exp Toxicol*. 2003 Jul;22(7):355-62.
- Waal, Y.C., Eijssbouts, H.V., Winkel, E.G., Winkelhoff, A.J. (2016). Microbial Characteristics of Peri-Implantitis : A Case-Control Study. *J Periodontol*. 2017 Feb;88(2):209-217.

4 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O acúmulo de biofilme patogênico em regiões de mucosa oral ou peri-implantar é responsável por infecções graves em hospedeiros que possuam fatores de risco como imunossupressão ou deficiência em realizar a higiene oral adequadamente (Peleg et al., 2010). Atualmente, o tratamento destas infecções é realizado pelo uso de antimicrobianos, a exemplo dos derivados azólicos (miconazol e fluconazol) (Vipulanandan et al., 2017; Berkow, Lockhart., 2017) e nistatina (derivado poliênico). Entretanto, nos casos de peri-implantite, o controle de biofilme oral entre usuários de próteses implanto suportada se dá preferencialmente pelo uso de soluções antimicrobianas de uso local, na forma de bochechos, a exemplo da clorexidina 0,12%.

Entretanto, são observadas limitações terapêuticas, como o tempo de tratamento e outros efeitos adversos, com destaque para a resistência antimicrobiana (Nobakht et al., 2017). Devido a isso, pesquisas recentes buscam terapias alternativas baseadas em produtos naturais que possam minimizar esses efeitos (Ferreira et al., 2015), e por isso, no presente estudo, foram avaliados o efeito inibitório do cinamaldeído, α -terpineol e própolis vermelha frente à biofilmes de *Candida spp.*

Os resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) encontrados neste estudo demonstraram que o cinamaldeído e o α -terpineol produziram potencial atividade antimicrobiana frente a cepas padrões de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida krusei*; e clínicas de *C.albicans*. Este é um achado promissor, visto que as duas substâncias apresentaram efeitos similares aos de produtos disponíveis comercialmente.

Geralmente, a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e fitoconstituintes não está relacionada a um único mecanismo, mas vários processos ocorrem simultaneamente a nível celular. O primeiro é a geração de danos irreversíveis à membrana dos micro-organismos resultando em perdas citoplasmáticas, íons e substratos, levando à morte por necrose celular (Almeida et al., 2016). Além disso, o estabelecimento de um gradiente de pH através da membrana citoplasmática é fundamental para o processo de ruptura dessa estrutura, o que justifica o uso desses produtos como alternativas viáveis para o tratamento de infecções fúngicas (Abdelouaheb; Amadou., 2012).

No presente estudo, o α -terpineol obteve CIM que variou de 312,5 $\mu\text{g/mL}$ a 40 $\mu\text{g/mL}$. Ramage et al (2012) avaliaram o efeito inibitório de α -terpineol em cepas de *Candida albicans*, onde observaram que após um período de 4h houve uma diminuição significativa da sua capacidade de inibir o crescimento desses microrganismos. Isso pode ser explicado pela presença de grupos hidroxila na estrutura química do α -terpineol, tornando-o solúvel em água, o que poderia justificar uma menor concentração encontrada nesse estudo para culturas plantônicas (Sharifi-Rad et al., 2017).

Em contrapartida, neste estudo foram observados menores valores de CIM para cinamaldeído quando comparado com α -terpineol. Frente a cepas clínicas de *Candida albicans*, obteve-se CIM de 78 $\mu\text{g/mL}$ a 20 $\mu\text{g/mL}$. Cepas clínicas determinam um desafio maior ao efeito de antimicrobianos, pois são fenotipicamente distintas de cepas padrão, de modo que a o cinamaldeído também apresentou efeito positivo frente a estas amostras. Além disto, essa substância também foi analisada quanto a capacidade de inibir biofilmes de *Candida albicans* e *Candida glabrata* em superfícies de titânio.

A peri-implantite consiste na inflamação dos tecidos peri-implantares devido ao acúmulo de biofilme patogênico (Suárez-López et al., 2016). Frequentemente são observados fungos do gênero *Candida* envolvidos nesta infecção, especialmente quando estão relacionados com espécies estreptocócicas, potencializando a virulência de *C. albicans* nesse biofilme através da regulação dos genes ALS3, SAP2 e SAP6, sugerindo que *C. albicans* é dependente de espécies bacterianas associadas no biofilme peri-implantar (Cavalcanti et al., 2016).

Na análise de viabilidade celular e metabolismo, utilizando-se o modelo de biofilme, o cinamaldeído não apresentou-se satisfatório quando comparado à própolis vermelha, sugerindo que a concentração utilizada neste estudo não tenha sido suficiente para inibir a síntese da parede celular e promover danos ao equilíbrio osmótico da célula. Este fenômeno ocorre graças à presença do grupo hidroxila na molécula, o que também é observado em outros aldeídos, como o 2,4-di-hidroxibenzaldeído e 2-hidroxi-3-metoxibenzaldeído (Harohally, Cherita, Bhatt., 2017). Entretanto, não está na literatura se concentrações superiores de cinamaldeído podem ser tóxicas para células humanas, sendo necessários

estudos adicionais que avaliem uma concentração que seja inibitória e pouco citotóxica.

Em contrapartida, a própolis vermelha demonstrou resultados semelhantes aos da clorexidina, substância considerada padrão ouro para tratamento químico da peri-implantite, principalmente nos biofilmes uniespécie. Embora sua atividade em biofilmes de *Candida albicans* e *Candida glabrata* seja eficaz, a própolis vermelha possui como desvantagem a sua viscosidade elevada e a pigmentação do extrato. Essas duas características podem ser um entrave para seu uso em pesquisas clínicas e *in situ*.

Embora o tratamento de forma exclusiva com agentes químicos não seja eficaz para casos de peri-implantite (Hu et al., 2017), é importante destacar que a redução da biomassa do biofilme e principalmente da carga microbiana são os fatores fundamentais relacionados nesse tipo de terapêutica (Wiedmer et al., 2017). O desafio torna-se maior na presença de biofilmes mistos, onde existam relações de sinergismo, sugerindo que sejam avaliados modelo de co-infecção que considerem a presença de espécies bacterianas como *Streptococcus spp.*

Entretanto, os achados deste estudo podem nortear pesquisas futuras que avaliem biofilmes mistos e possíveis efeitos citotóxicos do cinamaldeído, terpineol e própolis vermelha. Além disso, uma variável também a ser estudada é o tempo de formação de biofilme e o número de exposições aos antimicrobianos. No presente estudo foram utilizados biofilmes iniciais (24h), mas a literatura apresenta evidências de que, em biofilmes maduros, hifas de espécies de *Cândida* antigem uma maior virulência (Peleg et al., 2010). Adicionalmente, estruturas complexas de biofilme não permitem que agentes antimicrobianos possam atuar de maneira efetiva (Freitas-Fernandes et al., 2014). Por isso, a avaliação do efeito inibitório dessas substâncias nesses biofilmes é necessária.

Diante do exposto verifica-se que o cinamaldeído, terpineol e própolis vermelha obtiveram atividade inibitória frente à espécies de *Candida spp.* Entretanto, são necessários estudos para avaliar a ação dessas substâncias levando em consideração variáveis que simulem o hospedeiro e a cavidade bucal.

5 CONCLUSÃO

- O cinanaldeído apresentou efeito inibitório frente culturas planctônicas padrões e clínicas de *Candida albicans* e não *albicans*, entretanto não demonstrou a mesma atividade em biofilmes desenvolvidos em superfícies de titânio.

- O α -terpineol demonstrou atividade antifúngica frente culturas planctônicas de *Candida albicans* e não *albicans*. Entretanto, são necessários estudos adicionais que possam avaliar a citotoxicidade dessa substância em células humanas.

- Nos biofilmes desenvolvidos sobre superfícies de titânio, a própolis vermelha obteve resultados promissores, sendo uma alternativa viável de tratamento para peri-implantite.

REFERÊNCIAS*

Abdelouaheb; D. Amadou. The Therapeutic Benefits of Essential Oils, Nutrition, Well-Being and Health, Dr. Jaouad Bouayed (Ed.). 2012. InTech, DOI: 10.5772/25344. Available from: <https://www.intechopen.com/books/nutrition-well-being-and-health/the-therapeutic-benefits-of-essential-oils>

Almeida Lde F, Paula JF, Almeida RV, Williams DW, Hebling J, Cavalcanti YW. Efficacy of citronella and cinnamon essential oils on *Candida albicans* biofilms. *Acta Odontol Scand*. 2016 Jul;74(5):393-8.

Almeida LFD, Cavalcanti YW, Castro RD, Lima EO. Atividade antifungica de óleos essenciais frente a amostras clínicas de *Candida albicans* isoladas de pacientes HIV positivos. *Rev Bras Plantas Med*. 2012;14(4):649–55.

Apatzidou D, Lappin DF, Hamilton G, Papadopoulos CA, Konstantinidis A, Riggio MP. Microbiome of peri-implantitis affected and healthy dental sites in patients with a history of chronic periodontitis. *Arch Oral Biol*. 2017 Nov;83:145-152.

Baj A, Beltramini GA, Bolzoni A, Cura F, Palmieri A, Scarano A, Ottria L, Gianni AB. Bacterial colonization of the implant-abutment interface of conical connection with an internal octagon: an in vitro study using real-time PCR. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2017 Apr-Jun;31(2 Suppl 1):163-168.

Basholli-Saliu M, Schuster R, Hajdari A, Mulla D, Viernstein H, Mustafa B, Mueller M. Phytochemical composition, anti-inflammatory activity and cytotoxic effects of essential oils from three *Pinus* spp. *Pharm Biol*. 2017 Dec;55(1):1553-1560.

Cannon RD, Lyons KM, Chong K, Holmes AR. Adhesion of yeast and bacteria to oral surfaces. *Methods Mol Biol*. 2010;666:103-24.

***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.**

Cavalcanti IM, Del Bel Cury AA, Jenkinson HF, Nobbs AH. Interactions between *Streptococcus oralis*, *Actinomyces oris*, and *Candida albicans* in the development of multispecies oral microbial biofilms on salivary pellicle. *Mol Oral Microbiol*. 2017 Feb;32(1):60-73.

Cavalcanti IM, Nobbs AH, Ricomini-Filho AP, Jenkinson HF, Del Bel Cury AA. Interkingdom cooperation between *Candida albicans*, *Streptococcus oralis* and *Actinomyces oris* modulates early biofilm development on denture material. *Pathog Dis*. 2016 Apr;74(3)(b).

Cavalcanti YW, Wilson M, Lewis M, Del-Bel-Cury AA, da Silva WJ, Williams DW. Modulation of *Candida albicans* virulence by bacterial biofilms on titanium surfaces. *Biofouling*. 2016;32(2):123-34(a)

Costa CR, Cohen AJ, Fernandes OF, Miranda KC, Passos XS, Souza LK, do Rosário Rodrigues Silva M. Asymptomatic oral carriage of *Candida* species in HIV-infected patients in the highly active antiretroviral therapy era. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2006;48(5):257-61.

Costa LF, Amaral CD, Barbirato DD, Leão AT, Fogacci MF. Chlorhexidine mouthwash as an adjunct to mechanical therapy in chronic periodontitis: A meta-analysis. *J Am Dent Assoc*. 2017 May;148(5):308-318.

Dantas Silva RP, Machado BA, Barreto GA, Costa SS, Andrade LN, Amaral RG, Carvalho AA, Padilha FF, Barbosa JD, Umsza-Guez MA. Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. *PLoS One*. 2017. 30;12(3):e0172585.

do Nascimento TG, da Silva PF, Azevedo LF, da Rocha LG, de Moraes Porto IC, Lima E Moura TF, Basílio-Júnior ID, Grillo LA, Dornelas CB, Fonseca EJ, de Jesus Oliveira E, Zhang AT, Watson DG. Polymeric Nanoparticles of Brazilian Red Propolis Extract: Preparation, Characterization, Antioxidant and Leishmanicidal Activity. *Nanoscale Res Lett*. 2016; 11(1):301.

Ferreira GL, Pérez AL, Rocha ÍM, Pinheiro MA, de Castro RD, Carlo HL, Lima EO, Castellano LR. Does scientific evidence for the use of natural products in the

treatment of oral candidiasis exist? A systematic review. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015; 15;01:123-131.

Freires IA, de Alencar SM, Rosalen PL. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. *Eur J Med Chem*. 2016 Mar 3;110:267-79.

Gow NA, van de Veerdonk FL, Brown AJ, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol*. 2011. 12;10 (2):112-22.

Harriott MM, Noverr MC. Importance of *Candida*-bacterial polymicrobial biofilms in disease. *Trends Microbiol*. 2011 Nov;19 (11):557-63.

Htet M, Madi M, Zakaria O, Miyahara T, Xin W, Lin Z, et al. Decontamination of anodized implant surface with different modalities for peri-implantitis treatment: Lasers and mechanical debridement with citric acid. *J Periodontol* 2016;87(8):953-961

Hu KF, Lin YC, Ho KY, Chou YH. Compliance with Supportive Periodontal Treatment in Patients with Dental Implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2017 Nov/Dec;32(6):1364–1370.

Javed F, Abduljabbar T, Carranza G, Gholamiazizi E, Mazgaj DK, Kellesarian SV, Vohra F. Efficacy of periimplant mechanical debridement with and without adjunct antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of periimplant diseases among cigarette smokers and non-smokers. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2016;16:85-89.

John G, Becker J, Schmucker A, Schwarz F. Non-surgical treatment of peri implant mucositis and peri-implantitis at two-piece zirconium implants: A clinical follow-up observation after up to 3 years. *J Clin Periodontol*. 2017 Jul;44(7):756-761.

Lourenço AG, Ribeiro AERA, Nakao C, Motta ACF, Antonio LGL, Machado AA, Komesu MC. Oral *Candida* spp carriage and periodontal diseases in HIV-infected patients in Ribeirão Preto, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2017 Jun 1;59:e29.

Mencio F, De Angelis F, Papi P, Rosella D, Pompa G, Di Carlo S. A randomized clinical trial about presence of pathogenic microflora and risk of peri-implantitis: comparison of two different types of implant-abutment connections. *Eur Ver Med Pharmacol Sci*. 2017;21(7):1443-1451.

Menezes KM, Fernandes-Costa AN, Silva-Neto RD, Calderon PS, Gurgel BCV. Efficacy of 0.12% chlorhexidine gluconate for non-surgical treatment of peri-implant mucositis. *J Periodontol* 2016; 87(11):1305-1313

Nogueira MNM, Aquino SG, Rossa C, Spolidorio DMP. Terpinen-4-ol and alpha-terpineol (tea tree oil components) inhibit the production of IL-1, IL-6 and IL-10 on human macrophages. *Inflamm Res*. 2014; 63(9):769–78.

Oldoni TL, Cabral IS, d'Arce MA, Rosalen PL, Ikegaki M, Nascimento AM, Alencar SM. 2011. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. *Sep Purif Technol*. 2010; 77:208–213

Oyemitan IA, Elusiyan CA, Onifade AO, Akanmu MA, Oyedeji AO, McDonald AG. Neuropharmacological profile and chemical analysis of fresh rhizome essential oil of *Curcuma longa* (turmeric) cultivated in Southwest Nigeria. *Toxicol Rep*. 2017 Jul 17;4:391-398.

Peleg AY, Hogan DA, Mylonakis E. Medically important bacterial-fungal interactions. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(5):340-9.

Pina GM, Lia EN, Berretta AA, Nascimento AP, Torres EC, Buszinski AF, de Campos TA, Coelho EB, Martins VP. Efficacy of Propolis on the Denture Stomatitis Treatment in Older Adults: A Multicentric Randomized Trial. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2017; 2017:1-9.

Ramage G, Milligan S, Lappin DF, Sherry L, Sweeney P, Williams C, et al. Antifungal, cytotoxic , and immunomodulatory properties of tea tree oil and its derivative components : potential role in management of oral candidosis in cancer patients. 2012;3(June):1–8.

Samaranayake L. Commensal oral *Candida* in Asian cohorts. *Int J Oral Sci*. 2009 Mar;1(1):2-5.

Sawaya AC, Palma AM, Caetano FM, Marcucci MC, Cunha IBS, Araujo CE, et al. Comparative study of in vitro methods used to analyse the activity of própolis extracts with different compositions against species of *Candida*. *Lett Appl Microbiol*. 2002;35(3):203-7.

Schwarz F, Becker K, Rahn S, Hegewald A, Pfeffer K, Henrich B. Real-time PCR analysis of fungal organisms and bacterial species at peri-implantitis sites. *Int J Implant Dent*. 2015;1(1):9.

Sharifi-Rad J, Salehi B, Varoni EM, Sharopov F, Yousaf Z, Ayatollahi SA, Kobarfard F, Sharifi-Rad M, Afdjei MH, Sharifi-Rad M, Iriti M. Plants of the *Melaleuca* Genus as Antimicrobial Agents: From Farm to Pharmacy. *Phytother Res*. 2017 Oct;31(10):1475-1494.

Shreaz S, Wani WA, Behbehani JM, Raja V, Irshad M, Karched M, Ali I, Siddiqi WA, Hun LT. Cinnamaldehyde and its derivatives, a novel class of antifungal agents. *Fitoterapia*. 2016;112:116-31.

Taguchi Y, Hasumi Y, Hayama K, Arai R, Nishiyama Y, Abe S. Effect of cinnamaldehyde on hyphal growth of *C. albicans* under various treatment conditions. *Med Mycol J*. 2012;53(3):199–204.

Taguchi Y, Hayama K, Okada M, Sagawa T, Arai R, Abe S. Therapeutic effects of cinnamaldehyde and potentiation of its efficacy in combination with methylcellulose on murine oral candidiasis. *Med Mycol J*. 2011;52(2):145-52.

Taguchi Y, Takizawa T, Ishibashi H, Sagawa T, Arai R, Inoue S, et al. Therapeutic effects on murine oral candidiasis by oral administration of cassia (*Cinnamomum cassia*) preparation. *Japanese J Med Mycol*. 2010;51(1):13–21.

Taha AM, Eldahshan OA. Chemical Characteristics, Antimicrobial, and Cytotoxic Activities of the Essential Oil of Egyptian *Cinnamomum glanduliferum* Bark. *Chem Biodivers*. 2017 May;14(5).

Talei GR, Mohammadi M, Bahmani M, Kopaei MR. Synergistic effect of *Carum copticum* and *Mentha piperita* essential oils with ciprofloxacin, vancomycin, and gentamicin on Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Int J Pharm Investig*. 2017 Apr-Jun;7(2):82-87.

Vipulanandan G, Herrera M, Wiederhold NP, Li X, Mintz J, Wickes BL, Kadosh D. Dynamics of Mixed- *Candida* Species Biofilms in Response to Antifungals. *J Dent Res*. 2017 Aug 1;22034517729351

Waller SB, Madrid IM, Ferraz V, Picoli T, Cleff MB, de Faria RO, et al. Cytotoxicity and anti-*Sporothrix brasiliensis* activity of the *Origanum majorana* Linn. oil. *Braz J Microbiol*. 2016;47(4):896–901.

Wiedmer D, Petersen FC, Lönn-Stensrud J, Tiainen H. Antibacterial effect of hydrogen peroxide-titanium dioxide suspensions in the decontamination of rough titanium surfaces. *Biofouling*. 2017;33(6):451-459.

Wohlfahrt JC, Evensen BJ, Zeza B, Jansson H, Pilloni A, Roos-Jansåker AM, Di Tanna GL, Aass AM, Klepp M, Koldsland OC. A novel non-surgical method for mild peri-implantitis- a multicenter consecutive case series. *Int J Implant Dent*. 2017;3(1):38.

Yan Z, Liu X, Liu Y, Han Y, Lin M, Wang W, Guan X, Zhu S, Zhang H, Wang Q, Chou L, Zhu X, Hua H. The Efficacy and Safety of Miconazole Nitrate Mucoadhesive Tablets versus Itraconazole Capsules in the Treatment of Oral Candidiasis: Na Open-Label, Randomized, Multicenter Trial. *PLoS One*. 2016 Dec 15;11(12):e0167880.

ANEXO

Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba.

UNIVERSIDADE FEDERAL DA
PARAÍBA - CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Bioatividade, biocompatibilidade e biomecânica de condicionadores de tecido modificados por fitoconstituintes

Pesquisador: Leopoldina de Fátima Dantas de Almeida

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 55844316.9.0000.5188

Instituição Proponente: Programa de Pós-graduação em Odontologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.593.178

Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa da aluna do Programa Nacional de Pós Doutorado Leopoldina de Fátima Dantas de Almeida vinculada ao Programa de Pós Graduação em Odontologia (PPGO) pela Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar a atividade antimicrobiana, biocompatibilidade e biomecânica de condicionadores de tecido associados a um fitoconstituente.

Objetivo Secundário: Objetivo específico 1: Avaliar a atividade antimicrobiana de fitoconstituintes isolados, bem como determinar os efeitos da associação destes a materiais condicionadores de tecidos frente a biofilmes multiespécie de *C. albicans* (ATCC 90028) e isolados clínicos.

Objetivo específico 2: Determinar a biocompatibilidade de materiais condicionadores de tecido associados a fitoconstituintes frente linhagens celulares de queratinócitos e fibroblastos gengivais humanos, por meio de testes de citotoxicidade.

Objetivo específico 3: Avaliar as propriedades biomecânicas dos materiais em associação ao fitoconstituente.

Endereço: UNIVERSITÁRIO S/N

Bairro: CASTELO BRANCO

CEP: 58.051-900

UF: PB

Município: JOAO PESSOA

Telefone: (83)3216-7791

Fax: (83)3216-7791

E-mail: eticaccs@ccs.ufpb.br

Continuação do Parecer: 1.593.178

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Não são detectados riscos para os doadores de amostras gengivais, visto que a coleta do material será realizada apenas diante da necessidade de procedimento cirúrgico expressamente consentida pelo doador e responsável pela clínica.

Benefícios: Os benefícios esperados pelo presente projeto determinam a produção de um novo material com atividades biológicas favoráveis aos tecidos oral, contudo com atividade antimicrobiana melhorada.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O presente projeto é dividido em três etapas experimentais que contemplam os objetivos do estudo, sendo elas:

- Estudos da atividade antimicrobiana e anti-biofilme (estudo 1);
- Estudos da atividade citotóxica e de biocompatibilidade (estudo 2);
- Estudos das propriedades biomecânicas (estudo 3).

Será realizado um estudo experimental laboratorial no qual os fatores de estudo (variáveis independentes) consistirão nas diferentes concentrações do fitoconstituente avaliado. As variáveis respostas (variáveis dependentes), por sua vez, serão representadas pela viabilidade celular, bioatividade, expressão gênica e estrutura dos biofilmes; viabilidade celular dos modelos de avaliação de citotoxicidade; bem como energia livre de superfície, resistência a tração dos materiais modificados.

A parte que utiliza material biológico (amostras de tecido gengival n=3) serão coletadas de paciente submetido a procedimentos cirúrgicos de ulectomia na Clínica de Odontopediatria, Departamento de Clínica e Odontologia Social da Universidade Federal da Paraíba e então utilizadas para os ensaios de citotoxicidade. Vale ressaltar que a coleta do material será efetuada quando o procedimento for realizado, com expresso consentimento do doador ou responsável por este e o professor chefe da disciplina.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Anexados.

Recomendações:

Todos os resultados de uma pesquisa deverão ser divulgados junto aos participantes da mesma, assim como na(s) instituição(ões) onde os dados foram obtidos.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Considero este projeto sem pendências ou inadequações.

Endereço: UNIVERSITÁRIO S/N
Bairro: CASTELO BRANCO CEP: 58.051-900
UF: PB Município: JOÃO PESSOA
Telefone: (83)3216-7791 Fax: (83)3216-7791 E-mail: eticaccs@ccs.ufpb.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA
PARAÍBA - CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE**



Continuação do Parecer: 1.593.178

Este é meu parecer, salvo melhor juízo.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_711150.pdf	01/06/2016 10:00:21		Aceito
Folha de Rosto	folharostatoatual.PDF	01/06/2016 09:59:23	Leopoldina de Fátima Dantas de Almeida	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	assentimento.pdf	31/05/2016 10:54:50	Leopoldina de Fátima Dantas de Almeida	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE3105.pdf	31/05/2016 10:54:04	Leopoldina de Fátima Dantas de Almeida	Aceito
Outros	Parecer2.PDF	06/05/2016 08:17:03	Leopoldina de Fátima Dantas de Almeida	Aceito
Outros	Parecer1.PDF	06/05/2016 08:16:41	Leopoldina de Fátima Dantas de Almeida	Aceito
Outros	compromisso.pdf	06/05/2016 08:15:47	Leopoldina de Fátima Dantas de Almeida	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.pdf	06/05/2016 08:14:58	Leopoldina de Fátima Dantas de Almeida	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	06/05/2016 08:13:54	Leopoldina de Fátima Dantas de Almeida	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	06/05/2016 08:12:12	Leopoldina de Fátima Dantas de Almeida	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	LACEC.PDF	06/05/2016 08:08:42	Leopoldina de Fátima Dantas de Almeida	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Clinica.PDF	06/05/2016 08:08:30	Leopoldina de Fátima Dantas de Almeida	Aceito
Declaração de	Micologia.PDF	06/05/2016	Leopoldina de	Aceito

Endereço: UNIVERSITARIO S/N

Bairro: CASTELO BRANCO

CEP: 58.051-900

UF: PB

Município: JOAO PESSOA

Telefone: (83)3216-7791

Fax: (83)3216-7791

E-mail: eticaccs@ccs.ufpb.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DA
PARAÍBA - CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE



Continuação do Parecer: 1.593.178

Instituição e Infraestrutura	Micologia.PDF	08:08:16	Fátima Dantas de Almeida	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Numetrop.PDF	06/05/2016 08:07:57	Leopoldina de Fátima Dantas de Almeida	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JOAO PESSOA, 16 de Junho de 2016

Assinado por:

Eliane Marques Duarte de Sousa
(Coordenador)

Endereço: UNIVERSITARIO S/N
Bairro: CASTELO BRANCO CEP: 58.051-900
UF: PB Município: JOAO PESSOA
Telefone: (83)3216-7791 Fax: (83)3216-7791 E-mail: eticaccs@ccs.ufpb.br