



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS



JEFFERSON RODRIGUES NOBREGA

**Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* do α -pineno sobre
Candida spp. isoladas de pacientes com otomicose**

João Pessoa - PB

2019

JEFFERSON RODRIGUES NOBREGA

**Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* do α -pineno sobre *Candida* spp.
isoladas de pacientes com otomicose**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento aos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de concentração: Farmacologia.

ORIENTADORA: Prof^ª. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima.

João Pessoa - PB

2019

**Catlogação na publicação Seção de
Catlogação e Classificação**

N754a Nobrega, Jefferson Rodrigues.

Avaliação da atividade antifúngica in vitro do α -pineno sobre *Candida* spp. isoladas de pacientes com otomicose / Jefferson Rodrigues Nobrega. - João Pessoa, 2019.
63 f. : il.

Orientação: EDELTRUDES DE OLIVEIRA LIMA.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Monoterpenos. 2. Atividade antimicrobiana. 3. *Candida Parapsilosis*. 4. Ácido bórico. I. LIMA, EDELTRUDES DE OLIVEIRA. II. Título.

UFPB/BC

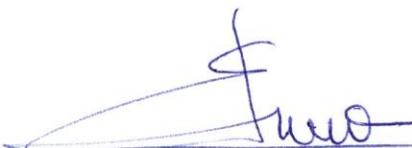
JEFFERSON RODRIGUES NOBREGA

**Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* do α -pineno sobre *Candida* spp.
isoladas de pacientes com otomicose**

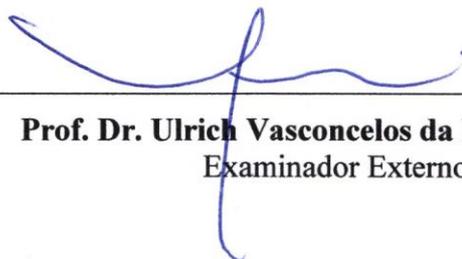
Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento aos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de concentração: Farmacologia.

Aprovado em 28 de fevereiro de 2019.

Banca Examinadora



Prof.^a Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima
Orientadora



Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes
Examinador Externo

Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhães
Examinador Interno

João Pessoa – PB

2019

DEDICATÓRIA

... A minha avó, Maria das Neves Oliveira, por toda luta e dedicação na vida para propiciar o amor à família, tornando-se uma fonte inspiradora a todos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à minha família por tornar esse trabalho possível. Principalmente, aos meus amáveis pais, João Josias da Nóbrega Filho e Giovana de Oliveira Rodrigues, que são alicerces e fundamental fonte de motivação em minha vida.

Ao meu grande irmão e à minha sobrinha, Jackson e Heloísa, que apesar da distância sempre me ajudaram a conquistar os melhores sonhos da vida.

À minha esposa e companheira de todas as horas, Paula Mariane, pelo constante incentivo e pela ajuda nas horas difíceis. Minha fonte de esperança, prosperidade e conquistas.

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima, que me inspira e tenho o maior respeito, por ter concedido o prazer da sua ajuda, dos seus conselhos e ensinamentos indispensáveis, também por ser um modelo de profissional e pessoa a qual anseio me espelhar e com quem posso continuar aprendendo.

Ao Professor e amigo Wylly Araújo de Oliveira, por ser a pessoa que me inspirou a conquistar esse título. Agradecerei sempre pela confiança e oportunidade que me proporcionou.

Aos meus colegas de turma, em especial as minhas amigas Edileuza Bezerra e Ana Laura que sempre estiveram ao meu lado tornando as aulas menos cansativas e as noites de estudo mais animadas.

Também aos meus melhores amigos Jéssica Feitosa, João Antônio, Roberto e Sarah Rebeca que sempre se preocuparam e ajudaram na medida do possível. Em especial a minha inesquecível amiga Luana Gomes.

Aos colegas de laboratório, Daniele de Figueiredo, Hermes Diniz, Daianne Medeiros, José Lucas e Lyvia Layanne. Por todo auxílio na execução e construção desta pesquisa e pela contínua troca de informações e conhecimentos.

A todos os professores do Programa de PgPNSB, que foram tão importantes ao passar os valiosos ensinamentos, conselhos e por apresentarem a grandeza da profissão acadêmica. Assim como os técnicos e funcionários da UFPB pela grande ajuda, esforço e desenvolvimento profissional para com os alunos.

À secretaria e coordenação do Programa, pelo alto nível de compromisso para com as necessidades dos discentes e incansáveis esforços para garantir um programa de alto nível.

Aproveito a oportunidade para agradecer ao CNPq pelo apoio financeiro.

À UFPB por fornecer os recursos necessários para o desenvolvimento desta pesquisa.

A todos que de alguma forma contribuíram com este trabalho, o meu muito obrigado!

“Se, na verdade, não estou no mundo para simplesmente a ele me adaptar, mas para transformá-lo; se não é possível mudá-lo sem um certo sonho ou projeto de mundo, devo usar toda possibilidade que tenho para não apenas falar de minha utopia, mas participar de práticas com ela coerentes.”

(FREIRE, 2014)

RESUMO

NOBREGA, J. R. **Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* do α -pineno sobre *Candida* spp. isoladas de pacientes com otomicose.** 2019. 62p. Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba. 2019.

Os fungos destacam-se em meio as doenças infecciosas devido ao aumento da incidência e das taxas de morbidade e mortalidade. Esses micro-organismos são geralmente de natureza oportunista, capazes de desenvolver diversas infecções, entre elas, otomicose. Esta é uma infecção causada por fungos filamentosos e/ou leveduras que acomete o sistema auditivo. Os principais agentes etiológicos envolvidos na otomicose são espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Candida*. O tratamento dessa infecção envolve a eliminação dos fatores de risco, remoção de detritos, uso de substância antisséptica e/ou fármacos antifúngicos. No entanto, com o aumento do número de casos de otomicose, o pequeno número de agentes antifúngicos disponíveis, aliado do uso de substância antisséptica sem segurança comprovada e com o aumento de cepas fúngicas resistentes, encorajam pesquisadores pela busca por terapias alternativas, especialmente por derivados de plantas e seus metabólitos, o qual destaca-se o α -pineno. O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antifúngica do α -pineno contra espécies de *Candida* isoladas de otomicose, por meio dos ensaios *in vitro* de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Fungicida Mínima (CFM) e avaliação das alterações micromorfológicas na presença do fitoconstituente, bem como investigar o efeito da associação entre o monoterpene e o ácido bórico, empregando a técnica de *Checkerboard*. O α -pineno apresentou atividade antifúngica significativa frente as estirpes ensaiadas, com superior atividade inibitória frente a espécie *C. parapsilosis*. Além disso, a CFM frente as cepas *C. albicans* e *C. parapsilosis* caracterizou a atividade do monoterpene como fungicida. O α -pineno demonstrou ainda ser eficaz em inibir o aparecimento de estruturas fúngicas, como pseudo-hifas e causar acentuada diminuição de blastoconídios. Além disso, o estudo de associação entre o fitoconstituente e o ácido bórico produziu efeitos aditivos, sendo os melhores resultados observados sobre as cepas de *C. parapsilosis*. Pode-se ainda inferir que apesar de resultados sinérgicos não terem sido evidenciados nesse trabalho, é importante destacar que resultados antagônicos não foram produzidos nas combinações testadas. Os dados obtidos no presente trabalho fornecem expectativas mais claras para estudos farmacológicos futuros, além de destacar a importância do α -pineno como notável composto antifúngico e estimular sucessivas pesquisas no intuito de viabilizar sua inserção na terapêutica tradicional, otimizando as estratégias farmacológicas contra otomicose.

Palavras chave: Monoterpenos. Atividade antimicrobiana. *Candida parapsilosis*. Ácido bórico.

ABSTRACT

NOBREGA, J. R. **Evaluation of the *in vitro* antifungal activity of α -pinene on *Candida* spp. isolated from otomycosis patients.** 62p. Master's Degree - Program of Post-Graduation in Natural Products and Bioactive Synthetics, Federal University of Paraíba. 2019.

Fungi stand out among infectious diseases due to the increased incidence and rates of morbidity and mortality. These microorganisms are generally opportunistic in nature, capable of developing various infections, including otomycosis. This is an infection caused by filamentous and/or yeast fungi that affects the auditory system. The main etiological agents involved in otomycosis are species belonging to the genera *Aspergillus* and *Candida*. Treatment of this infection involves elimination of risk factors, debris removal, use of antiseptic and/or antifungal drugs. However, the increased number of otomycosis cases, the small number of antifungal agents available, the use of antiseptic substances without proven safety, and the increase of resistant fungal strains have aroused researcher's interest in the search for alternative therapies, especially for derivatives of plants and their metabolites, which stands out the monoterpene α -pinene. The objective of this work was to evaluate the antifungal activity of α -pinene against *Candida* species isolated from otomycosis, by means of *in vitro* assays for the determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Fungicidal Concentration (MFC) and evaluation of micromorphological alterations in the presence of the phytoconstituent, as well as investigating the effect of the association between monoterpene and boric acid, using the *Checkerboard* technique. The α -pinene showed significant antifungal activity against the strains tested, with superior inhibitory activity against *C. parapsilosis* species. In addition, MFC against strains *C. albicans* and *C. parapsilosis* characterized fungicidal monoterpene. α -Pinene has also been shown to be effective in inhibiting the onset of fungal structures, such as pseudohifas, and causing a marked decrease in blastoconidia. Finally, the study of association between phytoconstituent and boric acid produced additive effects, the best results being observed on the strains of *C. parapsilosis*. However, although synergic results were not evidenced in this study, it is important to note that antagonistic results were not produced in any of the combinations performed. The data obtained in the present study provide clearer expectations for future pharmacological studies, besides highlighting the importance of α -pinene as a remarkable antifungal compound and stimulating successive researches in order to enable its insertion into traditional therapeutics, optimizing pharmacological strategies against otomycosis.

Keywords: Monoterpenes. Antimicrobial activity. *Candida parapsilosis*. Boric acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Anatomia do ouvido externo, médio e interno.	18
Figura 2 – Parede celular, membrana fúngica e mecanismo de ação dos azóis.	22
Figura 3 - Molécula do ácido bórico.	24
Figura 4 - Fórmula estrutural dos enantiômeros α e β -pineno.....	26
Figura 5 - Preparação do inóculo.....	32
Figura 6 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).	33
Figura 7 - Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM).	34
Figura 8 - Efeito do α -pineno sobre a micromorfologia fúngica.	36
Figura 9 - Ensaio <i>Checkerboard</i>	37
Figura 10 - Efeito do α -pineno na micromorfologia de espécies de <i>Candida</i> . (A) <i>C. albicans</i> ATCC® 60193™. (B) <i>C. albicans</i> LM-19. (C) <i>C. parapsilosis</i> ATCC® 22019™. (D) <i>C. parapsilosis</i> LM-87. ** Comparação com o controle (P < 0,05). Teste Mann-Whitney.....	44
Figura 11 - Micromorfologia. (A) <i>C. albicans</i> ATCC® 60193™ na ausência do α -pineno. (B) <i>C. albicans</i> ATCC® 60193™ na CIM do fitoconstituente. (C) <i>C. parapsilosis</i> ATCC® 22019™ na ausência do monoterpene. (D) <i>C. parapsilosis</i> ATCC® 22019™ na CIM do α -pineno.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$) do α -pineno, clotrimazol e ácido bórico contra espécies de <i>Candida</i>	39
Tabela 2 – Concentração Fungicida Mínima ($\mu\text{g/mL}$) do α -pineno contra <i>C. albicans</i> e <i>C. parapsilosis</i>	42
Tabela 3 – Estudo da combinação entre α -pineno e ácido bórico contra espécies de <i>Candida</i>	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASD	<i>Agar Sabouraud Dextrose</i>
ATCC®	<i>American Type Culture Collection</i>
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIF	Concentração Inibitória Fracionada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
ICIF	Índice da Concentração Inibitória Fracionada
LM	Laboratório de Micologia
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
3 OBJETIVOS	28
3.1 OBJETIVO GERAL.....	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO	29
4.2 ASPECTOS ÉTICOS	29
4.3 PRODUTOS TESTES.....	30
4.4 MEIOS DE CULTURA.....	30
4.5 CEPAS DO GÊNERO Candida	30
4.6 INÓCULO	31
4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	32
4.7.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	32
4.7.2 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM).....	33
4.7.3 Efeito do α -pineno sobre a micromorfologia fúngica	34
4.7.4 Ensaio Checkerboard.....	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1 DETERMINAÇÃO DA CIM E CFM	38
5.2 EFEITO DO α -PINENO SOBRE A MICROMORFOLOGIA	43
5.3 ENSAIO CHECKERBOARD	46
6 CONCLUSÕES.....	48
REFERÊNCIAS.....	49
ANEXOS.....	56

1 INTRODUÇÃO

Os fungos patogênicos emergiram nas últimas décadas como uma ameaça global crescente à saúde humana. Esses micro-organismos são geralmente de natureza oportunista, capazes de causar diversos tipos de infecções, principalmente, em indivíduos com sistema imunológico comprometido; ou que utilizam, por longo período, equipamentos médico-hospitalares; ou submetidos a processos cirúrgicos; ou por condições em que se produz meio susceptível ao crescimento do micro-organismo. Esses organismos causam doenças de um espectro variando de infecções superficiais que afetam 1,7 bilhões de indivíduos em todo o mundo, a infecções invasivas que matam milhões de indivíduos ao ano (BROWN et al., 2012; SPITZER; ROBBINS; WRIGHT, 2017).

A otomicose é uma infecção fúngica bastante comum em ambulatórios de otorrinolaringologia. É uma infecção fúngica que afeta na maioria dos casos apenas o canal auditivo externo. Raramente, podem envolver a orelha média, se houver acometimento da membrana timpânica (PONTES et al., 2009; ALI et al., 2018). Os sintomas comuns associados a essa infecção incluem prurido, dor, plenitude auricular, descarga auditiva, deficiência auditiva e/ou zumbido. Os principais fatores de risco para otomicose são condições higiênicas deficientes; traumas menores; inflamação ou lesão física; prática de natação; e exposição à atmosferas quentes e úmidas (ABDELAZEEM, 2015; AGARWAL; DEVI, 2017).

A otomicose tem sido uma causa preocupante e desafiadora para profissionais da saúde ao longo dos anos. Além disso, é de frequente recorrência e pode causar complicações graves. Essa infecção é responsável por aproximadamente 9-13% das infecções do canal auditivo, e os patógenos mais envolvidos na colonização do ouvido são entre os fungos filamentosos, espécies de *Aspergillus*; e entre as leveduras, o gênero *Candida* (SATISH, VISWANATHE, MANJULADEVI, 2013; HAGIWARA et al., 2018).

A problemática e alta prevalência de infecções ocasionadas por *C. albicans* continuam, no entanto, com o desenvolvimento de métodos de identificação molecular, o número de infecções causadas por espécies não-*albicans* têm aumentado. Este grupo inclui, entre outras, as espécies *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*. A patogenicidade de *Candida* spp. é atribuída aos diversos fatores de virulência apresentados por este gênero, entre eles: adesão de células epiteliais; capacidade de formação de biofilmes; secreções enzimáticas hidrolíticas etc. Além disso, a produção de biofilme está relacionada a um alto nível de

resistência antifúngica, bem como contribui para a persistência da infecção. Na otomicose, essas leveduras crescem e se fixam no sistema auditivo, formando uma massa de detritos (SILVA et al., 2012^a; RODRIGUES; SILVA; HENRIQUES, 2014; SILVA et al., 2017).

O tratamento na otomicose envolve a remoção de detritos do canal e completa limpeza; uso de agentes antifúngicos e/ou uso de substâncias antissépticas. Os antifúngicos disponíveis para o tratamento incluem medicamentos de administração tópica ou sistêmica, utilizando-se de mecanismos diversos com atividade fungistática ou fungicida. Além dos fármacos antifúngicos, outras substâncias são usadas no tratamento de otomicose, incluindo os agentes antissépticos (SHARIFYNIA et al., 2016).

Os antissépticos são formulações utilizadas para inibir ou eliminar o crescimento de micro-organismos quando aplicados sobre a pele ou mucosas (PEREIRA et al., 2015). Diversos estudos destacam a importância e a grande utilização destes compostos no tratamento de otomicose, entre eles, o ácido bórico destaca-se pelas propriedades bacteriostáticas e fungistáticas apresentadas. Estudos recentes mostram as suas várias aplicações, como: inseticida, conservante e lubrificante, além de ser utilizado em escala industrial (SCHMIDT, 2017; SALIHOGLU et al., 2017).

O aparecimento de cepas multirresistentes aos antifúngicos é um fenômeno crescentemente reconhecido. Além disso, a toxicidade apresentada pelos antifúngicos e o pequeno número de medicamentos disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas têm chamado a atenção para a busca de novos compostos com propriedades antifúngicas eficazes (SILVA et al., 2012^a; PAULA et al., 2014; CAMPOY; ADRIO, 2017).

Os produtos naturais se mostram como uma das principais fontes de substâncias potencialmente ativas, que podem produzir tratamentos eficazes tornando-se cada vez mais importantes e estudadas. Entre eles, as plantas têm sido amplamente utilizadas na medicina a um longo período de tempo, em particular, na medicina popular, pois podem ser aplicadas a diversas doenças, são facilmente acessíveis e representam uma ótima alternativa econômica. No entanto, diversos são os compostos produzidos nos vegetais, que se classificam em metabólitos primários ou secundários. Esses são os responsáveis pela variabilidade biológica apresentada pelas plantas, os quais se destacam os óleos essenciais por apresentarem atividade antimicrobiana intrínseca (SARDI et al., 2013; NASCIMENTO JÚNIOR et al., 2016).

Os óleos essenciais apresentam-se como misturas líquidas, voláteis, límpidas e coloridas de vários compostos aromáticos, merecendo destaque por serem misturas complexas constituídas, predominantemente, por substâncias da família dos terpenoides, entre eles se destacam os monoterpenos por suas atividades biológicas marcantes. Entre os monoterpenos bicíclicos destaca-se o α -pineno, um fitoconstituente monoinsaturado, com odor resinoso, podendo ser encontrado principalmente em óleos essenciais de coníferas. Sua atividade biológica vem sendo estudada cada vez com maior intensidade, devido aos significativos resultados encontrados (HIM et al., 2008; SATOU et al., 2014; EDUARDO et al., 2018).

Considerando a importância clínica da otomicose causada por leveduras do gênero *Candida*, e baseando-se no potencial biológico contido nos monoterpenos, se faz necessário o estudo para avaliar a atividade antifúngica de fitoconstituintes com promissora atividade antifúngica, além de observar as possíveis alterações micromorfológicas provocadas por esses metabólitos, e conseqüentemente avaliar sua possível inserção como uma nova opção terapêutica. Além disso, o estudo de monoterpenos quando associados com substâncias antifúngicas já utilizadas nessa condição clínica, pode apontar para novas possibilidades terapêuticas no tratamento da otomicose, ou por aumentar a eficácia, ou por evitar a inativação por inibir mecanismos de resistência.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

As infecções fúngicas se destacam em meio as doenças infecciosas devido à incidência e taxas de morbidade e mortalidade cada vez mais crescentes. Acredita-se que esse fato ocorra devido a utilização de tratamentos mais invasivos, como o transplante de células-tronco hematopoéticas, transplante de órgãos, uso de novos agentes quimioterápicos, imunomoduladores, acarretando o aumentando do número de pacientes imunocomprometidos, os quais são os mais afetados e que necessitam de tratamento a longo prazo (BROWN; DENNING; LEVITZ, 2012; SULEYMAN; ALANGADEN, 2016).

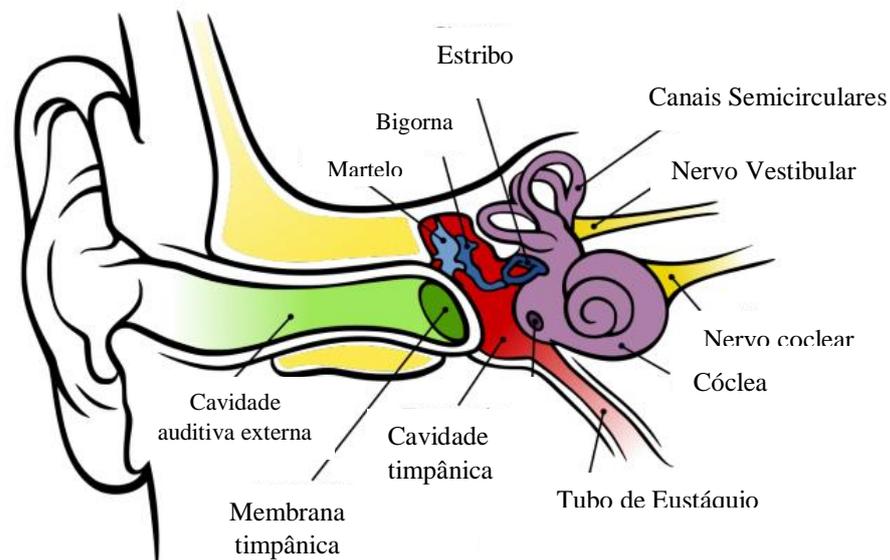
Apesar das infecções fúngicas ainda serem subestimadas e as mortes resultantes dessa condição clínica, frequentemente, negligenciadas, tais infecções tornam-se cada vez mais incidente. Por exemplo, no Brasil atualmente com uma população superior a 200 milhões de pessoas, nenhuma das infecções fúngicas em humanos está atualmente na lista de doenças relatadas oficialmente, mascarando a real incidência de infecções superficiais e/ou invasivas no país causadas por fungos. No entanto, observa-se com clareza que a incidência varia de acordo com regiões geográficas, hábitos culturais, condições socioeconômicas e condições individuais de risco para colonização por esses micro-organismos (GIACOMAZZI et al., 2016).

A otomicose ou otite fúngica é uma infecção unilateral ou bilateral de caráter superficial agudo, subagudo ou crônico causada por leveduras e/ou fungos filamentosos que acometem a orelha externa, incluindo o pavilhão auricular e o canal auditivo externo; e a orelha média quando ocorre perfuração do tímpano (Figura 1, p. 19). Também chamada e orelha de natação, otite tropical e orelha fétida, a maioria dos organismos fúngicos envolvidos nessa infecção são saprófitos, devido a exposição continuada da orelha a uma variedade de micro-organismo (HAJA; SHAIK; SIVA, 2017; KUMARAN; KAVITHA, 2017; ALARID-CORONEL et al., 2018). No contexto atual, a taxa de frequência de otomicose é maior entre os

pacientes na faixa etária de 26 a 50 anos. No entanto, esse perfil pode variar de acordo com a região geográfica e condições de estudo (ALI; ELHAG; IBRAHIM, 2018).

Diversos fatores de predisposição estão envolvidos na causa da otomicose, de origem fisiológica ou exógena, como: falhas nos mecanismos de defesa da orelha (alteração no pH do canal auditivo, alteração no epitélio de revestimento, mudanças quantitativas ou qualitativas da produção de cerume), trauma por limpeza excessiva, uso de prótese auditiva, uso de *piercing*, entrada de corpos estranhos no canal, exposição frequente a água (natação) ou associada a infecções bacterianas de origem desconhecida. Outros fatores de risco que se destacam, de forma geral, são: o uso de antibióticos de amplo espectro, o uso de esteroides, desordens endócrinas, neoplasias e doenças autoimunes (KAZEMI et al., 2015; CHERAGHSAHAR et al., 2017).

Figura 1 - Anatomia do ouvido externo, médio e interno.



Fonte: Adaptada de Chittka; Brockmann (2005, p. 564).

A otite fúngica é comumente associada a regiões geográficas tropicais, de clima quente e úmido (ABDELAZEEM et al., 2015). Além disso, fatores anatômicos relacionados ao canal auditivo, como tortuosidade, diâmetro e comprimento não são fatores de risco para o desenvolvimento da otomicose (BHALLY et al., 2004).

Estudos evidenciaram que os micro-organismos mais comuns isolados em casos de otomicose foram *Aspergillus niger*, seguido por *A. flavus*, *A. fumigatus*. Enquanto, espécies de

Candida são consideradas as principais entre as leveduras envolvidas nessa infecção (SATISH, VISWANATHE, MANJULADEVI, 2013; BARATI et al., 2011; PANCHAL et al., 2013; ANEJA et al., 2010; CHERAGHSAHAR et al., 2017). A diferença de variabilidade observada nesse tipo de infecção é explicada pela ampla distribuição geográfica e pelos diversos fatores ambientais que os fungos estão expostos (ALI et al., 2018).

Trabalhos publicados recentemente demonstram uma variedade de organismos fúngicos envolvidos na etiologia da otomicose, incluindo espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Candida*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Mucoraceae*, *Scopulariopsis*, *Alternaria* e *Malassezia*, bem como vários dermatófitos. É indiscutível que o gênero *Aspergillus* seja o de maior incidência, em especial, a espécie *A. niger*, sendo a mais isolada em estudos recentes, embora *A. flavus* e *A. fumigatus* também estejam entre as mais comuns (AGARWAL; DEVI, 2017; CHAPPE et al., 2018). Fato importante a se destacar é que o gênero *Candida* é considerado o segundo principal agente etiológico envolvido na otomicose, especialmente as espécies *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. auris* e *C. tropicalis*. Além disso, é fato que alguns estudos citam este gênero como principal micro-organismo isolado. Geralmente, *Candida* spp. estão envolvidas nessa infecção como patógeno único ou associado a outros micro-organismos (KUMARAN; KAVITHA, 2017; SURANENI et al., 2017; ALI et al., 2018). Por esta razão, destaca-se a importância do estudo com essas leveduras.

O gênero *Candida* tem se destacado nos últimos anos, por espécies deste gênero pertencerem a microbiota humana, podendo se tornar patógenos oportunistas, por meio da manifestação dos fatores de virulência do micro-organismo, devido às condições fisiológicas ou imunológicas do indivíduo. Entre os principais fatores de virulência associados ao gênero *Candida*, estão: adesão de células epiteliais; capacidade de formação de biofilmes; secreções enzimáticas hidrolíticas, tais como: proteases, fosfolipases e hemolisinas; evasão de células fagocitárias e transição entre estados de levedura e hifa, tornando-se capazes de adentrar tecidos (CHAVES; SANTOS; COLOMBO, 2012; CHAVES et al., 2013).

De acordo com sua classificação taxonômica, o gênero *Candida* pertence ao Domínio Eukarya, Reino Fungi, Divisão Eumycota, Subdivisão Deuteromycotina, Classe Hemiascomycetes, Ordem Saccharomycetales, Família Saccharomycetaceae, Gênero *Candida*. Sua composição é heterogênea e compreende mais de 200 espécies de organismos leveduriformes eucarióticos, que fazem parte da microbiota de diversas regiões do corpo, tais

como: orofaringe, cavidade bucal, brônquios, vagina e unhas (HOOG et al., 2001; SILVA et al., 2012^a).

No sistema auditivo, à medida que essas leveduras crescem, as camadas superficiais das células epiteliais são fundidas e preenchem o canal auditivo com uma massa de detritos, isso ocorre porque o processo infeccioso leva a um desequilíbrio lipídico/ácido da orelha, ocasionando um processo inflamatório (RATHOD et al., 2017). O comprometimento desse sistema fisiológico leva o indivíduo a apresentar diversos sintomas, como por exemplo: otalgia, otorreia, prurido, zumbido, plenitude aural, bloqueio e/ou perda auditiva. No entanto, muitas vezes essa infecção permanece despercebida e sem acompanhamento médico até ocorrer complicações graves, como rompimento do tímpano, que possivelmente levará a um duradouro acompanhamento e tratamento farmacológico (DHINGRA; DHINGRA, 2014; KUMAR; KUMAR; KUMAR, 2017).

O diagnóstico da otomicose é realizado por exame microscópico direto do material fúngico. Porém, esse exame pode apresentar resultados conflitantes, pois os detritos auditivos podem assemelhar-se a *Candida* spp. ou dermatófitos. Além disso, material insuficiente pode levar a resultados falso-negativos. Portanto, a cultura de células continua sendo o teste de diagnóstico desejável nesse tipo de infecção (ALARID-CORONEL et al., 2018). Em contrapartida, estudos afirmam que a cultura raramente é necessária, por não alterar o manejo farmacológico (GUITTEREZ et al., 2005; EDWARD; IRFANDY, 2012). Sabe-se que apesar de raramente ser uma ameaça à vida, a otomicose é um processo desafiador e frustrante para os pacientes, otorrinolaringologistas e demais profissionais de saúde, pois geralmente requer longo período de tratamento e acompanhamento (HO et al., 2006; MOFATTEH et al., 2018).

O tratamento intensivo da otomicose envolve desde a eliminação dos fatores de risco; remoção de detritos e limpeza completa do canal; até o uso de substâncias antissépticas e/ou fármacos antifúngicos (EDWARD; IRFANDY, 2012). Embora, vários estudos tenham avaliado a eficácia de diversos agentes antifúngicos, não existe um consenso ou protocolo a ser seguido sobre o fármaco mais efetivo para o tratamento. Por esta razão, várias classes de medicamentos antifúngicos têm sido usadas na clínica com sucesso variável, devido os micro-organismos envolvidos na otomicose serem de origem diversas, possuem perfis de susceptibilidade antifúngica variada ou ainda por apresentarem mecanismos de resistência. Outro componente fundamental do tratamento inclui manter o ouvido seco com o objetivo de restaurar as

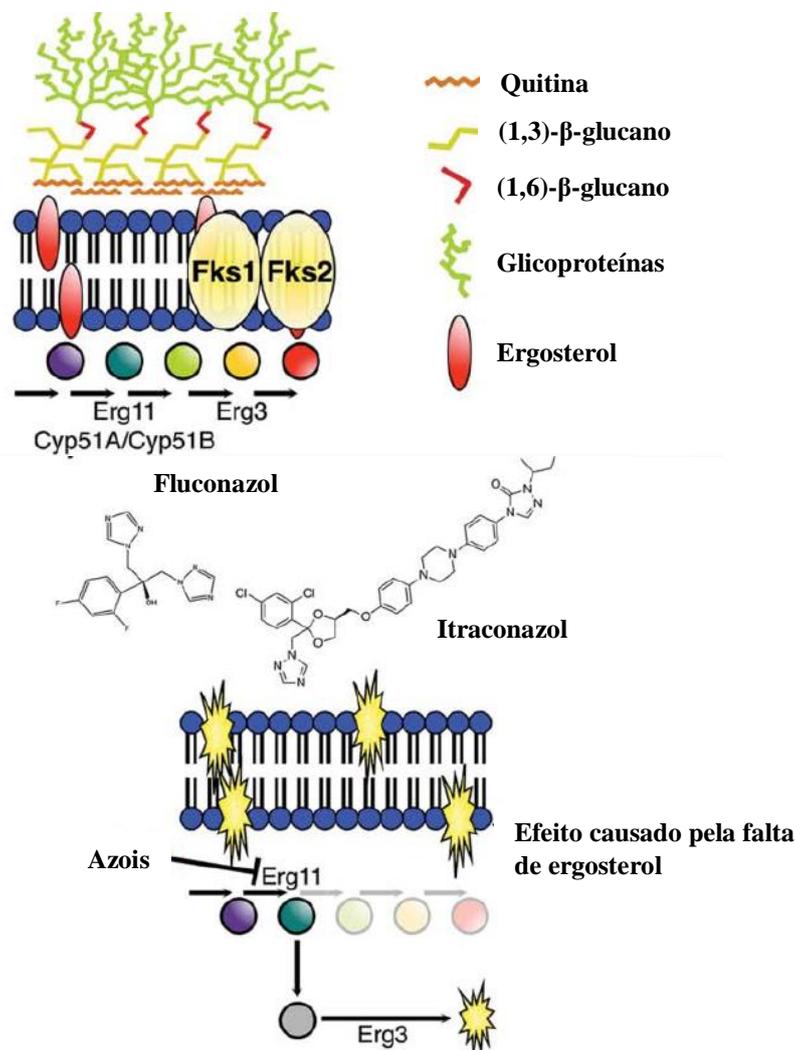
características fisiológicas do sistema (VENNEWALD; KLEMM, 2010; GHARAGHANI; SEIFI; MAHMOUDABADI, 2015; ALI; ELHAG; IBRAHIM, 2018).

Os compostos antifúngicos utilizados no tratamento da otite fúngica são, normalmente, administrados por via tópica e preparados como solução otológica estéril de baixa concentração. Os principais fármacos utilizados descritos na literatura são: clotrimazol, tioconazol, miconazol e nistatina. Entretanto, em muitos casos são administradas soluções ácidas e/ou desidratantes de administração otológica com características antissépticas e baixo efeito tóxico, como: ácido acético, ácido bórico, acetato de m-cresol, entre outros, acetato de fenil-mercúrio, acetato de alumínio (solução a 5%), violeta de genciana, entre outros (VENNEWALD; KLEMM, 2010; HAMZA et al., 2011; ROMSAITHONG et al., 2016).

Os azóis constituem a maior e principal classe de agentes antifúngicos utilizados na otomicose. Essa classe é constituída de moléculas orgânicas cíclicas, introduzidas pela primeira vez como antifúngicos na década de 1980. Esses antifúngicos podem ser classificados em dois grupos: imidazóis e triazóis. Os imidazóis (clotrimazol, miconazol e cetoconazol) foram os primeiros azóis desenvolvidos. No entanto, devido à sua alta toxicidade, efeitos colaterais graves e inúmeras interações com outros fármacos, eles foram substituídos pelos triazóis (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

De forma geral, os triazóis são compostos heterocíclicos com anel pentagonal. Seu mecanismo de ação funciona interrompendo a biossíntese do ergosterol promovendo a inibição da enzima 14- α -esterol desmetilase, uma enzima dependente do citocromo P-450, que é responsável pela conversão do lanosterol em ergosterol (Figura 2). Desta forma, promovem o comprometimento da biossíntese do principal esterol da membrana celular fúngica, causando uma alteração do equilíbrio hidroeletrolítico da membrana por desagregar o arranjo compacto das cadeias acil dos fosfolipídeos, interferindo nas funções de sistemas enzimáticos associados à membrana, promovendo falha no processo de replicação do fungo, inibindo assim o seu crescimento (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; CAMPOY; ADRIO, 2017).

Figura 2 – Parede celular, membrana fúngica e mecanismo de ação dos azóis.



Fonte: Adaptada de Spitzer; Robbins; Wright (2017, p. 171).

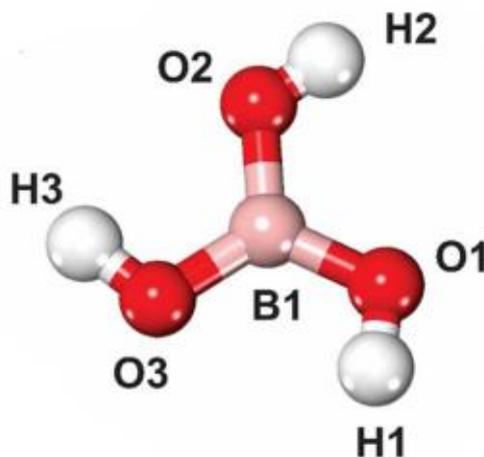
Nos Estados Unidos, o clotrimazol, em solução tópica otológica a 1%, é considerado o fármaco de primeira escolha para o tratamento de otomicose sem complicações. Embora, esse derivado imidazólico tenha eficácia comprovada contra um amplo espectro de patógenos e não tenha demonstrado ototoxicidade, ele não possui indicação específica para otomicose (MUNGUIA; DANIEL, 2008; CROWLEY; GALLAGHER, 2014). Entretanto, os estudos encontrados na literatura que utilizam desse tratamento são conduzidos com um número limitado de casos e a eficácia terapêutica, normalmente, é avaliada apenas pela resolução dos sintomas. Além disso, observa-se que a eficácia dos azóis na otomicose parece depender da duração do tratamento (SURANENI et al., 2017; OMRAN et al., 2018).

Em casos de otomicose refratária, crônica ou com comprometimento da membrana timpânica se faz necessário, na maioria dos casos, o uso de uma terapia antifúngica oral (RAVINDRAN; SAGESH, 2017). A terapia farmacológica utilizada nessa infecção é considerada limitada, quando comparada ao arsenal de antifúngicos disponíveis. Acredita-se que isso seja atribuído a via de administração pretendida para o tratamento ou aos possíveis efeitos tóxicos apresentados pelos antifúngicos (SILVA et al., 2012^a).

Além dos antifúngicos comercializados, outras substâncias com propriedades antifúngicas podem ser usadas no tratamento de otomicose, incluindo os agentes antissépticos. Os antissépticos são formulações utilizadas para inibir ou eliminar o crescimento de micro-organismos quando aplicados sobre a pele ou mucosas. Muitos apresentam atividade antifúngica significativa, entretanto, alguns fatores podem levar a ineficácia da ação dessas substâncias, incluindo a resistência dos micro-organismos, a inativação devido à diluição da substância ou o antagonismo quando usadas com outras substâncias (PEREIRA et al., 2015).

Diversos estudos destacam a importância e a grande utilização dos antissépticos no tratamento da otomicose. Entre eles, destaca-se o ácido bórico, também conhecido como ácido borácico, é um ácido inorgânico disponível na forma de pó cristalino branco, inodoro e facilmente solúvel em água, cuja fórmula molecular é H_3BO_3 (Figura 3, p. 24). Na natureza sua fraca produção se dá em minerais, água do mar e frutas. Tem propriedade antisséptica moderada com mecanismo de ação pouco claro. O ácido bórico também possui propriedades bacteriostáticas e fungistáticas. Apresentando várias outras aplicações, como: inseticida, conservante e lubrificante, além de ser utilizado em escala industrial. Na medicina é usado como antisséptico na lavagem ocular ou no tratamento de cortes e queimaduras menores, acne, aftas, podendo ainda ser usado no tratamento de segunda linha em infecções fúngicas vulvovaginais complicadas (IAVAZZO et al., 2011; SALIHOGLU et al., 2017). Nos últimos anos, também vem sendo empregado no tratamento de otite média, sendo administrado na concentração de 4% diluída em álcool a 70% ou água destilada (OZTÜRKCAN et al., 2009; LOOCK, 2012).

Figura 3 - Molécula do ácido bórico.



Fonte: Adaptado de Silva e colaboradores (2016, p. 6633).

O uso de soluções de ácido bórico como tratamentos antissépticos pode ser rastreado até o trabalho pioneiro de Lister, relatado em 1875, além de ser frequentemente recomendado na literatura não científica (WORBOYS, 2013). É importante ressaltar que não parece haver um mecanismo específico de resistência ao ácido bórico que diminua o potencial terapêutico dessa substância (SCHMIDT, 2017). Recentemente, estudos demonstraram que o ácido bórico atua, possivelmente, aumentando lentamente a permeabilidade da célula fúngica, diminuindo a síntese de ergosterol e causando a supressão da transformação de hifa-levedura (SCHMIDT et al., 2010; DE SETA; HUNTER; LARSEN, 2014). Outros estudos indicaram ainda que o ácido bórico pode ter uma influência nos mecanismos de biossíntese da parede celular em bactéria (DE SETA et al., 2009; POINTER; BOYER; SCHMIDT, 2015).

Devido ao aumento do número de casos relatados de otomicose e o pequeno número de fármacos antifúngicos disponíveis que possam ser utilizados nesse tipo de infecção, as substâncias antissépticas têm se tornado uma alternativa farmacológica para o tratamento da otomicose. No entanto, estudos com o propósito de garantir a segurança no uso otológico dessas substâncias devem ser realizados. Diante do exposto, faz-se necessária a busca por terapias alternativas, especialmente por derivados de plantas e seus metabólitos. Logo, esses compostos são reconhecidos como fontes de agentes terapêuticos de diversidade estrutural química com atividade biológica reconhecida (LAHLOU, 2007; NASCIMENTO JÚNIOR et al., 2016).

Diversas são as substâncias produzidas nos vegetais, que podem ser divididas em dois grandes grupos. O primeiro, denominado de metabólitos primários ou macromoléculas,

apresentam funções vitais bem definidas e são essenciais a manutenção e sobrevivência dos vegetais, incluem os lipídeos, glicídios, nucleotídeos e protídeos. O metabolismo das vias biossintéticas para produção dessas substâncias, originam, via gasto de energia. O primeiro grupo de compostos encontrados nos vegetais, são denominados por metabólitos secundários ou micromoléculas, geralmente apresentando estrutura complexa, baixa massa molecular e marcantes atividades biológicas. No entanto, são encontrados em baixas concentrações e em grupos de plantas específicas (POSER; MENTZ, 2004).

A atividade antimicrobiana apresentada pelas plantas é caracterizada pela presença de compostos químicos, oriundos do metabolismo secundário, como alcaloides, glicosídeos, óleos essenciais e seus fitoconstituintes, flavonoides, taninos e cumarinas. Além dessa propriedade intrínseca, tais substâncias podem alterar o efeito de fármacos antimicrobianos, seja aumentando ou diminuindo sua atividade. Além disso, a utilização dessas substâncias pode representar um avanço contra os mecanismos de resistência que inativam fármacos antimicrobianos (MIRON et al., 2014).

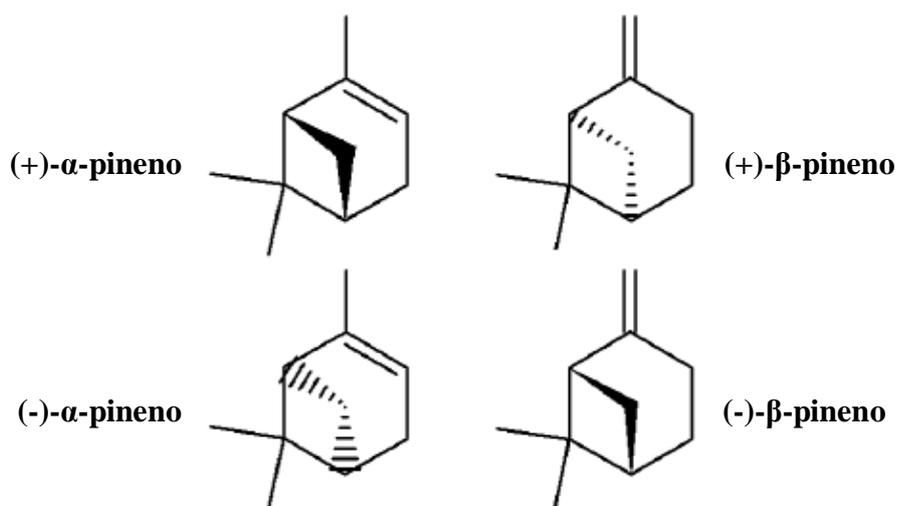
Dentre os metabólitos secundários derivados de plantas, destacam-se os óleos essenciais, os quais a Organização Internacional de Normalização (ISO/D1S9235.2) define como um produto feito por destilação com água ou vapor, ou por processamento mecânico ou por destilação a seco de materiais naturais. Eles aparecem como misturas líquidas, voláteis, límpidas e coloridas de vários compostos aromáticos. Os óleos essenciais são obtidos de todas as partes da planta, principalmente de ervas e especiarias, embora atualmente sejam examinadas novas fontes desse metabólito, como a partir de resíduos alimentares. Usos medicinais dessas substâncias são documentados com supostas atividades biológicas, como: anti-inflamatória, analgésica, sedativa, antimicrobiana, espasmolítica, anestésica, antioxidante, entre outras (AMORATI; FOTI; VALGIMIGLI, 2013; FENGFENG et al., 2017).

Os óleos essenciais são constituídos predominantemente por substâncias da família dos terpenos, que formam estruturalmente e funcionalmente diferentes classes de metabólitos pela combinação de unidades de isopreno (C_5H_8), que se origina do ácido mevalônico. O isopreno é um composto orgânico da classe dos alcadienos. Os principais compostos terpênicos são: os monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), triterpenos (C_{30}), tetraterpenos (C_{40}), polisoprenoides ($_nC$) e seus derivados oxigenados (terpenoides) (BAKKALI et al., 2008).

Os monoterpenos são divididos em três grandes subgrupos: os acíclicos (geraniol, citral e linalol); os monocíclicos (α -terpineol e terpinoleno); e os bicíclicos (α -pineno, β -pineno, tujona e fenchona). São arrastados pelo vapor d'água livres de outros componentes por serem altamente voláteis, geralmente são utilizados no meio industrial por suas características organolépticas marcantes (SIMÕES, SPITZER, 2010).

Os pinenos fazem parte do grupo dos monoterpenos bíclicos. Eles apresentam dois isômeros constitucionais ativos, ambos possuem enantiômeros conhecidos na natureza como (-)- α -pineno, (+)- α -pineno, (-)- β -pineno e (+)- β -pineno, podendo ocorrer em várias proporções dependendo da sua origem vegetal (Figura 4). A mistura racêmica está presente em alguns óleos essenciais e podem ser encontrados em plantas da região Nordeste do Brasil como a malvasanta, eucalipto, erva de santa maria, manjerição e pimenta preta (JUCÁ, 2007; TABANCA et al., 2007; YANG et al., 2011). Ambos os isômeros são produzidos a partir do difosfato de geraniol através da ciclização do difosfato de linalil, e seguido pela perda de prótons no carbocátion (DEWICK, 1997).

Figura 4 - Fórmula estrutural dos enantiômeros α e β -pineno.



Fonte: Silva e colaboradores (2012^b, p. 6306).

O α -pineno (2,6,6-trimetil bicíclico [3.1.1]-hept-2-eno) é um composto monoinsaturado, com um odor resinoso característico, tipo madeira. Esse fitoconstituente pode ser encontrado nos óleos essenciais de coníferas, alecrim e lavanda. Sob condições normais ele é altamente volátil, devido à sua alta pressão de vapor (HO et al., 2011). Em relação a sua atividade biológica, já é evidenciada propriedades larvicida (GOVINDARAJAN et al., 2016),

antinociceptiva (HIM et al., 2008), anti-inflamatória (KIM et al., 2017), antibacteriana (EDUARDO et al., 2018), além de prevenir o estresse oxidativo (KARTHIKEYAN et al., 2018). Também foi evidenciado que a inalação do α -pineno produziu efeito ansiolítico em um teste de labirinto elevado em ratos (SATOU et al., 2014). Foi comprovado ainda que a estimulação olfativa pelo fitoconstituente também induz relaxamento fisiológico, provocando uma diminuição significativa da frequência cardíaca (IKEI; SONG; MIYAZAKI, 2016).

Diante dessa realidade, faz-se necessária a experimentação de substâncias com promissor potencial antifúngico contra cepas do gênero *Candida* isoladas de otomicose, para que se possa determinar a atividade dessas substâncias e, conseqüentemente, estudar sua inserção como uma nova opção terapêutica. Ainda, tornar essas substâncias, uma alternativa que poderá ser explorada com o uso combinado com outros agentes antifúngicos, com o objeto de melhorar o tratamento ou extinguir a problemática frente a otomicose.

Baseado no potencial biológico contido nos monoterpenos, em especial no α -pineno, esse trabalho se propôs a avaliar a atividade antifúngica desse fitoconstituente frente estirpes de *Candida* ssp. e ainda, avaliar a atividade antifúngica das principais opções terapêuticas disponíveis utilizadas na otomicose, como: o clotrimazol e ácido bórico, a fim de que seja descoberta uma possível alternativa terapêutica no combate a esta infecção, seja no uso isolado do monoterpeno ou quando combinado com os agentes de caráter antifúngico descritos anteriormente.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a atividade antifúngica *in vitro* do α -pineno contra espécies de *Candida* isoladas de pacientes com otomicose.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do α -pineno contra cepas de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* isoladas de pacientes com otomicose;
- Determinar a CIM do clotrimazol e do ácido bórico frente os mesmos isolados;
- Determinar a Concentração Fungicida Mínima (CFM) do monoterpeno contra os organismos fúngicos em análise;
- Avaliar a interferência do monoterpeno sobre a micromorfologia das leveduras;
- Investigar o efeito da associação entre o fitoconstituente e ácido bórico frente a espécies de *Candida*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO

Os ensaios laboratoriais foram realizados no Laboratório de Micologia (LM) do Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, Paraíba, sob a coordenação da Prof.^a Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima. O laboratório dispõe de estrutura, substâncias, materiais e equipamentos adequados e suficientes para a realização dos experimentos descritos. O período de execução do estudo decorreu de março de 2017 até novembro de 2018.

4.2 ASPECTOS ÉTICOS

Foi solicitado ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos a isenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), com base na resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS) nº 466 de 12 de dezembro de 2012, item IV.8 que contempla a dispensa do TCLE em situações de impossibilidade de obtenção. Essa solicitação foi fundamentada por ser um estudo experimental, qualitativo-quantitativo, analítico/descritivo que contempla o uso dos micro-organismos isolados a partir dos exames micológicos de indivíduos com otomicose, que se encontravam armazenados como parte da rotina de uma instituição privada, localizada na cidade de João Pessoa, Paraíba. Portanto, as etapas do estudo foram realizadas sem adição de riscos ou danos aos participantes da pesquisa ou prejuízos ao bem-estar dos mesmos. Esse estudo foi conduzido após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, com parecer consubstanciado favorável (Anexo 1), número 2.410.809, no dia 01 de dezembro de 2017, João Pessoa, Paraíba pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos do CCS.

O pesquisador, orientador e demais colaboradores envolvidos no Projeto em questão se comprometem, individual e coletivamente, a utilizar os dados provenientes deste, apenas para os fins descritos e a cumprir todas as Diretrizes e Normas descritas na Resolução CNS nº466/12, e suas complementares.

4.3 PRODUTOS TESTES

O monoterpeno α -pineno foi adquirido da Sigma-Aldrich[®], São Paulo - SP, Brasil com grau de pureza de 98% e densidade igual a 0,858 g/mL. Para realização dos ensaios de avaliação da atividade antifúngica, o fitoconstituente foi solubilizado em água destilada estéril, com Tween 80 a 2% e Dimetilsulfóxido (DMSO) em uma proporção de até 10% (HOOD; WILKINSON; CAVANAGH, 2003).

O antifúngico padrão, clotrimazol, foi adquirido da Henrifarma Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda., São Paulo - SP, Brasil. Esse fármaco foi selecionado para a execução dos ensaios propostos por se tratar de um princípio ativo de uso terapêutico aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil, além de ser um fármaco de escolha utilizado na condição clínica em estudo.

O ácido bórico foi adquirido da Henrifarma Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda., São Paulo - SP, Brasil. Esse ácido foi utilizado para execução dos ensaios por se tratar de um composto antisséptico utilizado no tratamento de otomicose. O ácido bórico foi solubilizado em água destilada estéril no momento da realização dos ensaios.

4.4 MEIOS DE CULTURA

Para a manutenção das cepas e realização dos ensaios de atividade antifúngica foram utilizados, respectivamente, o Agar Sabouraud Dextrose (ASD) da *Difco Laboratories Ltd*, USA e o *Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI 1640), com L-glutamina e sem bicarbonato da Investigação Laboratorial Ltda. (INLAB), São Paulo - SP, Brasil. Os meios foram mantidos e preparados conforme as recomendações dos fabricantes. O ASD foi distribuído em tubos de ensaios de vidro neutro e esterilizados de 20 mm x 200 mm, em volume adequado, cerca de 8 mL, para semear colônias de leveduras. Enquanto, o RPMI 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato foi preparado e distribuído em tubos de ensaio de vidro neutro e esterilizados de 15 mm x 150 mm antes da realização dos ensaios.

4.5 CEPAS DO GÊNERO *Candida*

Para os ensaios da atividade antifúngica, foram utilizadas leveduras da linhagem padrão *American Type Culture Collection* (ATCC[®]) e originados de pacientes com otomicose. Foram utilizadas 14 amostras fúngicas, pertencentes as seguintes espécies:

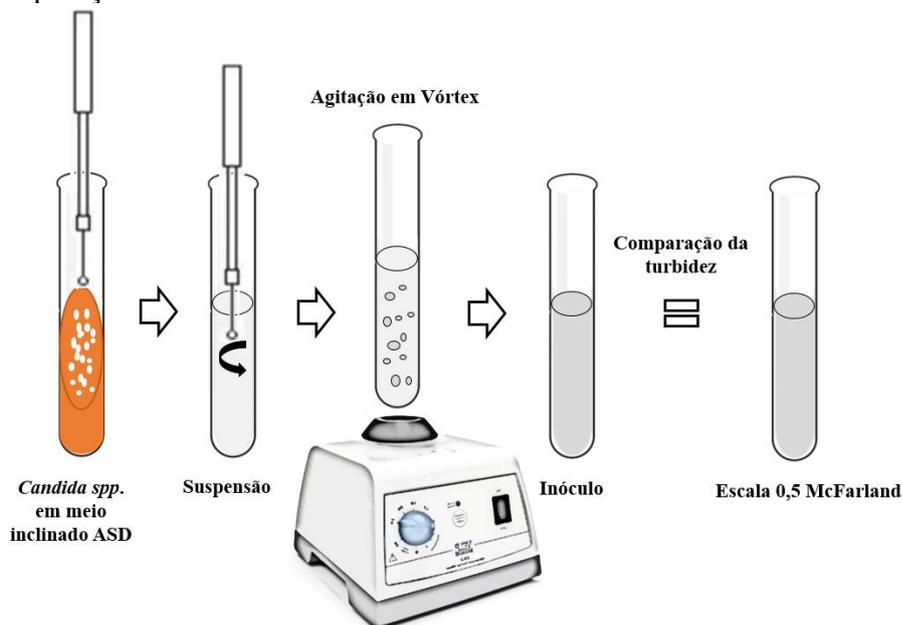
- *C. albicans* (Robin) Berkhout, 1923: LM-19, LM-133, LM-77, LM-701, LM-18 e ATCC® 60193™;
- *C. parapsilosis* (Ashford) Langeron et Talice, 1934: LM-87, LM-20, LM-107 e ATCC® 22019™;
- *C. tropicalis* (Castellani) Berkhout, 1931: LM-177, LM-808, LM-217 e ATCC® 13803™.

Os isolados clínicos foram obtidos a partir de um laboratório privado, localizado na cidade de João Pessoa, Paraíba - PB, Brasil como parte da rotina laboratorial. Os micro-organismos foram selecionados de acordo com a solicitação médica da coleta de material fúngico do canal auditivo, como suspeita de infecção de ouvido associada a espécies fúngicas. Após isolamento e identificação das espécies referentes ao gênero *Candida*, essas foram semeadas em ASD, e após seu crescimento, foram mantidas sob refrigeração a $\pm 4^{\circ}\text{C}$. As estirpes utilizadas estão depositadas e registradas na Micoteca do Laboratório de Pesquisa: Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, CCS, UFPB. Todas as estirpes foram repicadas em ASD e incubadas a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$, por 24-48 horas antecedentes ao experimento, a fim de revitalizá-las.

4.6 INÓCULO

Para preparação do inóculo, colônias de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* foram semeadas em ASD e incubadas a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$, por 48 horas antes da realização dos experimentos, como descrito anteriormente. Posteriormente, colônias dessas culturas foram suspensas em solução de cloreto de sódio 0,9% (NaCl 0,9%) esterilizada e, por fim, ajustadas de acordo com o padrão do tubo nº 0,5 da escala *McFarland* (Figura 5), para obtenção de um inóculo, com aproximadamente 10^6 Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/Mililitro (mL). No entanto, uma diluição na proporção 1:10 foi realizada no momento da execução de todos os experimentos, desta forma os ensaios foram realizados com inóculo final correspondente a, aproximadamente, 10^5 UFC/mL (HOLETZ et al., 2002; CLSI, 2017).

Figura 5 - Preparação do inóculo.



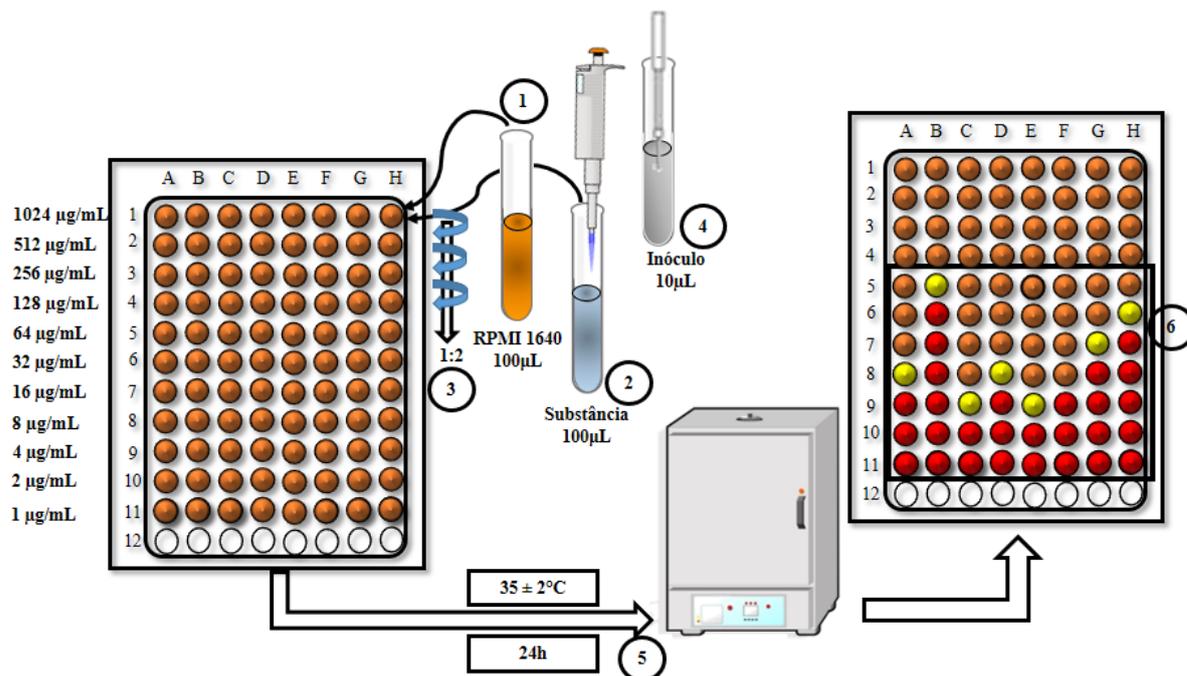
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

4.7.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM do α -pineno, clotrimazol e ácido bórico contra espécies de *Candida* foi realizada pela técnica de microdiluição em placa, contendo 96 poços com cavidade em formato de “U” (INLAB, São Paulo - SP, Brasil). Inicialmente, foram distribuídos 100 μ L de meio RPMI 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato nos poços das placas. Em seguida, 100 μ L do produto teste foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa, obtendo uma concentração inicial de 1.024 μ g/mL. Posteriormente, por meio de diluições seriadas à razão de dois (2:1), foram obtidas concentrações de 1.024 μ g/mL até 1 μ g/mL. Por fim, foram adicionados 10 μ L do inóculo das espécies de *Candida* nas cavidades, correspondendo a um inóculo final de 10^5 UFC/mL. Desta forma, cada coluna da placa corresponde a uma cepa fúngica. As placas foram assepticamente fechadas e incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas. Após este período foi realizada a leitura dos resultados. O valor da CIM foi definido como a menor concentração capaz de inibir o crescimento fúngico visível, quando comparado ao seu controle de crescimento, sendo confirmada pela observação da mudança colorimétrica do meio líquido utilizado, como indicativo de crescimento fúngico (Figura 6), sendo a concentração expressa em μ g/mL (CLEELAND; SQUIRES, 1991; HADACEK; GREGER, 2000; CLSI, 2017).

Figura 6 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).



Legenda: 1. Adição do meio líquido; 2. Adição do produto teste; 3. Diluições seriadas 2:1; 4. Adição do inóculo; 5. Incubação da placa; 6. Avaliação do crescimento fúngico.

Fonte: Elaborada pelo autor.

No momento da execução do experimento os controles foram testados, para verificação da ausência de interferência dos agentes emulsificantes (100 µL do RPMI 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato + 100 µL de solução com DMSO a 10% e Tween 80 a 2% + 20 µL do inóculo), controle de esterilidade do meio de cultura (apenas 100 µL do RPMI 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato) e controle de viabilidade do micro-organismo (100 µL do RPMI 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato + 10 µL do inóculo). Todos os ensaios foram realizados em triplicata e a média aritmética das CIMs obtidas nos ensaios foi calculada.

A atividade antifúngica do α -pineno foi interpretada e considerada como ativa ou inativa, conforme os seguintes critérios: até 500 µg/mL a substância é considerada com elevada atividade, entre 600 e 1.500 µg/mL moderada atividade; e CIM acima 1.500 µg/mL caracteriza o produto com fraca atividade ou inativo contra as cepas testadas (HOLETZ et al., 2002; SARTORATTO et al., 2004; HOUGHTON et al., 2007).

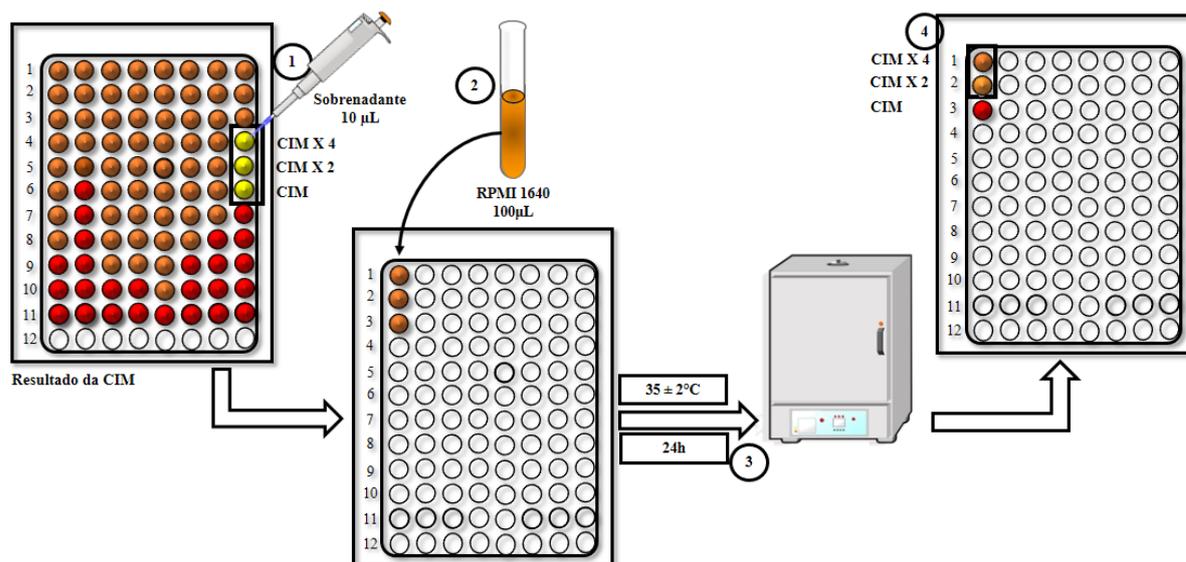
4.7.2 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Todas as cepas de *C. albicans* e *C. parapsilosis* foram ensaiadas para determinação da CFM do α -pineno. Primeiramente, alíquotas de 10 µL do sobrenadante da cavidade de cada

cepa onde foi observado inibição do crescimento fúngico (CIM, CIMx2 e CIMx4) foram adicionados a 100 μ L de caldo RPMI 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato e incubadas por 24 horas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Após este período a CFM foi considerada como a menor concentração do produto onde não houve crescimento do micro-organismo (Figura 7, p. 34). Os ensaios foram realizados em triplicata (NCUBE; AFOLAYAN; OKOH, 2008; BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016). Os controles de ausência de interferência pelos agentes emulsificantes, de viabilidade dos micro-organismos e de esterilidade do meio de cultura foram realizados e apresentaram resultados, respectivamente, positivo, positivo e negativo para os ensaios realizados.

O modo de ação do monoterpene foi caracterizado entre atividade fungistática ou fungicida a partir da razão CFM/CIM. O α -pineno foi considerado um agente com atividade fungicida quando $\text{CFM/CIM} < 4$ ou fungistático, caso $\text{CFM/CIM} \geq 4$ (SIDDIQUI et al., 2013). O resultado foi expresso pela média aritmética das CFMs obtidas para cada cepa.

Figura 7 - Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM).



Legenda: 1. Retirada do sobrenadante da CIM, CIMx2 e CIMx4; 2. Adição do meio líquido; 3. Incubação da placa; 4. Avaliação do crescimento fúngico.

Fonte: Elaborado pelo autor.

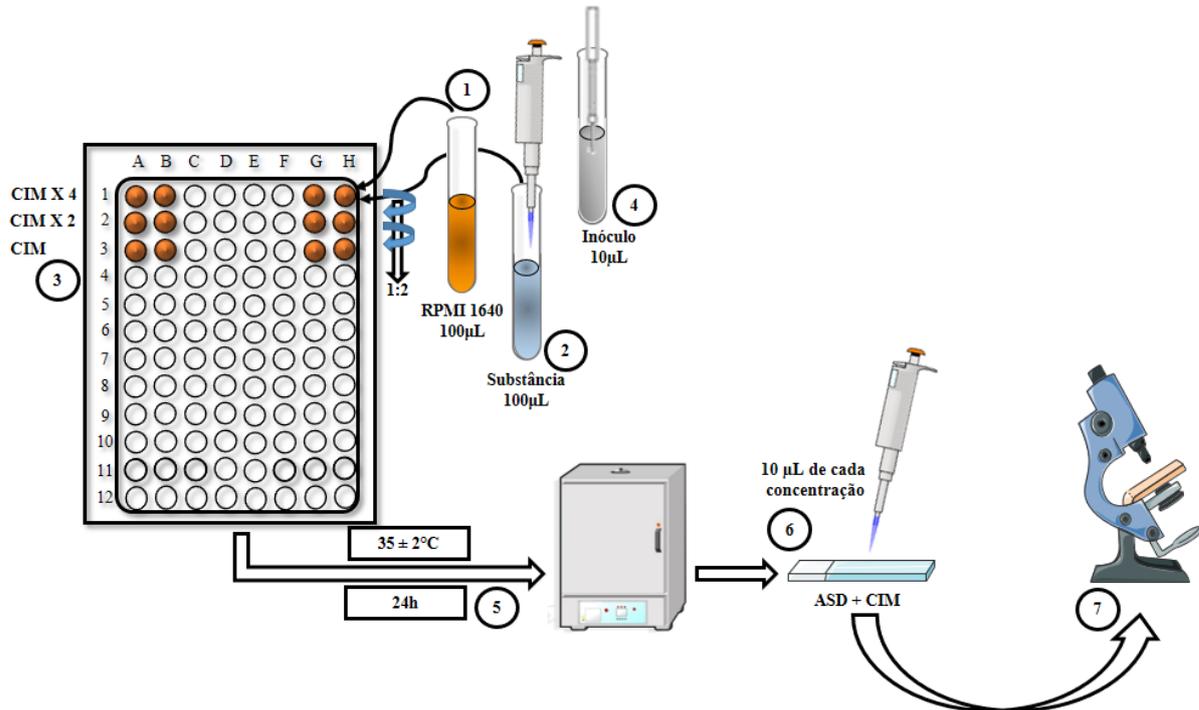
4.7.3 Efeito do α -pineno sobre a micromorfologia fúngica

Para o estudo das possíveis alterações morfológicas provocadas pelo α -pineno sobre as cepas de *C. albicans* ATCC[®] 60193[™] e LM-19; e *C. parapsilosis* ATCC[®] 22019[™] e LM-87, as linhagens foram subcultivadas frente a diferentes concentrações do α -pineno (CIM, CIMx2

e CIM \times 4). Inicialmente, foram distribuídos 100 μ L de RPMI 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato nos poços das placas de microdiluição. Em seguida, 100 μ L do α -pineno foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa, na concentração correspondente a CIM \times 4. Por meio de diluições seriadas à razão de dois (2:1), foi obtida concentrações de CIM \times 4 até CIM. Por fim, 10 μ L do inóculo foram adicionados nas cavidades, previamente padronizado de acordo com a escala do tubo nº 0,5 da escala *McFarland*, onde cada coluna da placa correspondeu a uma cepa fúngica específica. As placas foram acondicionadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas. Após esse período cada poço foi homogeneizado e uma alíquota de 10 μ L retirada para ser analisada por microscopia óptica, em um aumento de 400x (Figura 8, p. 35), para avaliação qualitativa será observada a presença ou não de estruturas características como blastoconídios e pseudo-hifas (ALVES et al., 2013).

O experimento foi realizado em triplicata e a média aritmética foi calculada a partir das estruturas presentes em cinco campos (em cruz) nas concentrações ensaiadas, em comparação ao controle de crescimento (100 μ L de RPMI 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato + 10 μ L do inóculo). A avaliação dos resultados encontrados foi executada em *software* estatístico *GraphPad Prisma* versão 7.03®, disponível em versão de teste válida para uso por tempo determinado. A análise estatística foi submetida a avaliação de amostras não paramétricas pelo teste U de *Mann-Whitney*.

Figura 8 - Efeito do α -pineno sobre a micromorfologia fúngica.



Legenda: 1. Adição do meio líquido; 2. Adição do produto teste; 3. Diluições seriadas 2:1; 4. Adição do inóculo; 5. Incubação da placa; 6. Esfregação em lâmina. 7. Avaliação das estruturas fúngicas.

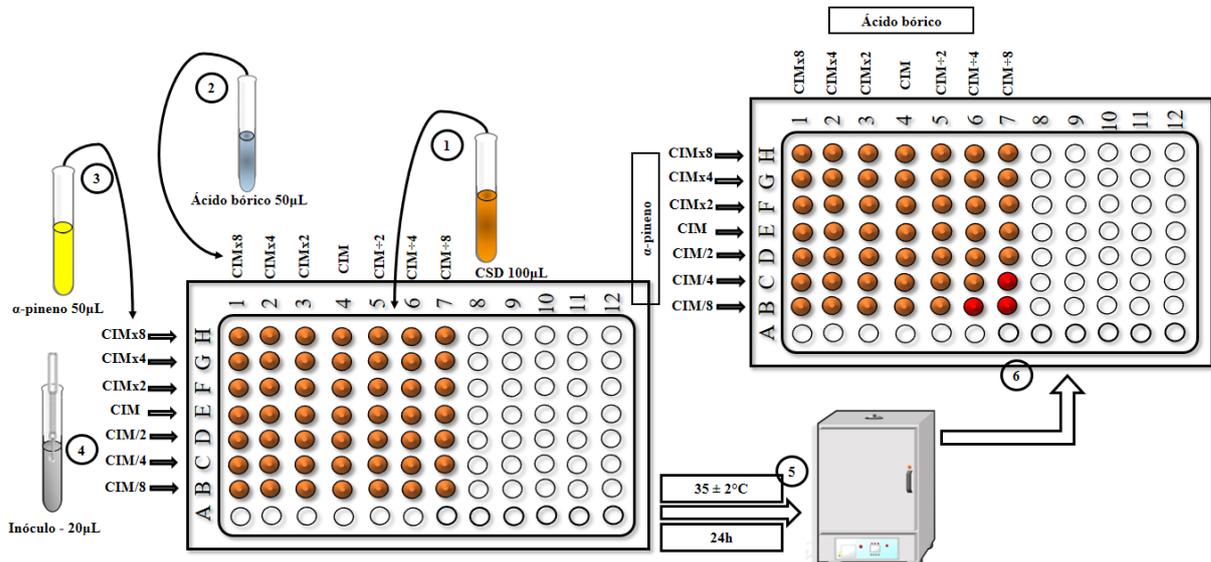
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.7.4 Ensaio *Checkerboard*

Após determinação da CIM do α -pineno e do ácido bórico contra as cepas de *Candida*, foi realizado o estudo de associação entre os produtos pela técnica de *Checkerboard*. Inicialmente, 100 μ L de RPMI 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato foram distribuídos na placa de 96 cavidades, com fundo em forma de “U” (INLAB, São Paulo-SP, Brasil). Posteriormente, 50 μ L do α -pineno nas concentrações CIM \times 8, CIM \times 4, CIM \times 2, CIM, CIM \div 2, CIM \div 4, CIM \div 8 foram adicionados no sentido horizontal. Em seguida, foi dispensado 50 μ L do ácido bórico nas concentrações CIM \times 8, CIM \times 4, CIM \times 2, CIM, CIM \div 2, CIM \div 4, CIM \div 8 no sentido vertical. Por último, foram acrescentados 20 μ L do inóculo padronizado correspondente a cada combinação. As placas foram incubadas a 35 \pm 2°C e a leitura feita após 24 horas para observação da presença ou não do crescimento fúngico visível (Figura 9, p. 36), assim como indicado pela mudança colorimétrica do meio líquido utilizado, indicando crescimento do micro-organismo (WHITE et al., 1996).

Todos os controles foram aplicados, com o objetivo de atestar a ausência de interferência pelos agentes emulsificantes, a esterilidade do meio de cultura utilizado e a viabilidade dos micro-organismos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Figura 9 - Ensaio *Checkerboard*.



Legenda: 1. Adição do meio líquido; 2. Adição do produto teste A; 3. Adição do produto teste B; 4. Adição do inóculo; 5. Incubação da placa; 6. Avaliação do crescimento fúngico.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para determinação do tipo de efeito produzido na associação de duas substâncias pela técnica de *Checkerboard*, os cálculos descritos pelos quatro métodos possíveis foram aplicados (BONAPACE et al., 2002). Diante dos resultados obtidos, a técnica de cálculo descrita por Anon (1992) foi empregada para reprodução dos valores encontrados na combinação. Dessa maneira, a Concentração Inibitória Fracionada (CIF) foi calculada para cada produto utilizado na associação, da seguinte forma:

$$CIF_A = \frac{\text{CIM do produto A na combinação}}{\text{CIM do produto A individual}} \text{ e } CIF_B = \frac{\text{CIM do produto B na combinação}}{\text{CIM do produto B individual}}$$

Posteriormente, o Índice da Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) foi calculado através da equação:

$$ICIF = CIF_A + CIF_B$$

Após determinação do ICIF, os resultados foram interpretados como: sinergismo ($ICIF \leq 0,5$); aditividade ($ICIF > 0,5$ e < 1); indiferença ($ICIF \geq 1$ e < 4); ou antagonismo ($ICIF \geq 4$) (LEWIS et al., 2002; CORREA-ROYERO et al., 2010).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dada a complexa variação genética que existe nos genomas eucarióticos, substâncias com promissora atividade antifúngica podem traçar novos mecanismos de ação, tratar micro-organismos resistentes, aumentar as alternativas de tratamento, diminuir a toxicidade apresentada pelos antifúngicos, surgir como uma alternativa economicamente viável ou ainda intensificar a eficácia do tratamento através de efeitos combinados. Diante disso, os resultados encontrados nesse estudo são fundamentais para o possível desenvolvimento e aprimoramento molecular de um novo fármaco antifúngico ou uma nova terapia antifúngica combinada em casos de otomicose.

5.1 DETERMINAÇÃO DA CIM E CFM

Os valores da CIM do α -pineno, clotrimazol e ácido bórico contra *Candida* spp. podem ser observados na Tabela 1, p. 38. O α -pineno apresentou CIM no intervalo entre 64 e 1.024 $\mu\text{g/mL}$. O monoterpene foi capaz de inibir, aproximadamente, 86% dos micro-organismos ensaiados. O melhor perfil de inibição do crescimento fúngico foi apresentado pela concentração de 128 $\mu\text{g/mL}$, inibindo 79% das cepas testadas. Enquanto, a concentração de 64 $\mu\text{g/mL}$ inibiu o crescimento de 35% das leveduras. O α -pineno apresentou melhor atividade antifúngica frente as cepas ATCC[®]. Dessa forma, baseando-se na concentração na qual o produto conseguiu inibir pelo menos 75% das cepas ensaiadas (CIM₇₅) e interpretando de acordo com os critérios de Sartoratto e colaboradores (2004) pode-se dizer que o fitoconstituente apresentou forte atividade antimicrobiana, com CIM₇₅ de 128 $\mu\text{g/mL}$.

Os métodos de diluição são os mais adequados para a determinação dos valores da CIM, uma vez que oferecem a possibilidade de estimar a concentração do agente antimicrobiano testado em meio sólido (diluição em ágar) ou meio líquido (macrodiluição ou microdiluição). O último pode ser utilizado para determinar quantitativamente a atividade antimicrobiana *in vitro* contra bactérias e fungos. Muitos protocolos clínicos são aprovados para o teste de suscetibilidade antimicrobiana por diluição em meio líquido para bactérias, leveduras e fungos filamentosos (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

A atividade fungicida ou fungistática dos óleos essenciais e seus fitoconstituintes, a literatura crescente sobre a elucidação dos mecanismos de ação envolvidos dessas substâncias, juntamente com o conhecimento sobre seus usos tradicionais, enfatizam as possíveis aplicações

desses produtos em diversos campos, inclusive na medicina humana. Diante disso, monoterpenos surgem como moléculas importantes para o desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos que sejam seguros para a saúde humana e ambiental (NAZZARO et al., 2017).

Tabela 1 - Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$) do α -pineno, clotrimazol e ácido bórico contra espécies de *Candida*.

Cepas	α -pineno	clotrimazol	ácido bórico	controles	
	CIM	CIM	CIM	Micro-organismo	RPMI
<i>C. albicans</i>					
LM-19	128	+	1.024	+	-
LM-133	128	+	1.024	+	-
LM-77	128	+	1.024	+	-
LM-701	128	+	1.024	+	-
LM-18	128	+	1.024	+	-
ATCC® 60193 TM	64	+	1.024	+	-
<i>C. parapsilosis</i>					
LM-87	64	+	1.024	+	-
LM-20	64	1.024	1.024	+	-
LM-107	64	1.024	1.024	+	-
ATCC® 22019 TM	64	1.024	1.024	+	-
<i>C. tropicalis</i>					
LM-177	+	+	+	+	-
LM-808	1.024	+	+	+	-
LM-217	+	+	+	+	-
ATCC® 13803 TM	64	+	1.024	+	-

Legenda: (+): Crescimento do micro-organismo; (-): Ausência de crescimento do micro-organismo; CIM: Concentração Inibitória Mínima.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados obtidos no presente estudo condizem com os recentemente encontrados por Rivera-Yañez e colaboradores (2017), que constataram que o α -pineno apresentou atividade contra *C. albicans* com CIM de 500 $\mu\text{g/mL}$ contra 50% das estirpes estudadas. Valor idêntico foi determinado em estudo prévio realizado por Jiang e colaboradores (2011) na avaliação da atividade antifúngica dos componentes químicos majoritários do óleo essencial de *Rosmarinus*

officinalis L., entre eles o α -pineno, contra *C. albicans*. No entanto, Silva e colaboradores (2012^b) avaliaram a atividade dos enantiômeros (+)- α -pineno e (-)- α -pineno contra *C. albicans*. Como resultado, puderam observar que o (+)- α -pineno apresentou CIM menor que a encontrada nesse trabalho, com valor de 3,125 $\mu\text{g/mL}$. Enquanto, o enantiômeros (-)- α -pineno não apresentou atividade contra a estirpe ensaiada.

Na avaliação do possível mecanismo de ação do fitoconstituente sobre espécies fúngicas, estudos demonstram que sua atividade é, possivelmente, por perturbar diretamente a integridade metabólica e constitucional da célula fúngica, inibindo a respiração celular e os processos de transporte iônico, além de modificar a composição da membrana plasmática, causando aumento da permeabilidade em *C. albicans* (LIMA et al., 2005; TANGARIFE-CASTAÑO et al., 2011).

Diversos estudos na literatura mostram a atividade biológica do α -pineno, incluindo antimicrobiana, no entanto até o presente momento não foi investigada a ação do monoterpene sobre espécies de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* isoladas a partir do sistema auditivo. Entretanto, estudos com óleos essenciais que apresentam o α -pineno como fitoconstituente majoritário, mostram resultados significativos contra as espécies descritas anteriormente (NAEINI; NADERI; SHOKRI, 2014; COSTA et al., 2017).

O clotrimazol não apresentou atividade significativa frente as cepas ensaiadas, como pode ser observado na Tabela 1, p. 39. Na concentração de 1.024 $\mu\text{g/mL}$, o antifúngico inibiu o crescimento de apenas 28% delas. A melhor atividade demonstrada foi contra a espécie *C. parapsilosis*. Anteriormente, estudo avaliando a susceptibilidade de espécies de *Candida* ao clotrimazol evidenciou que já existe um grande número de micro-organismos pertencentes a este gênero que apresentam mecanismos de resistência ao fármaco. O levantamento mostrou que entre as cepas utilizadas no estudo, *C. albicans*, *C. glabrata* e outras espécies de *Candida* apresentaram, respectivamente, 38,3%, 30,4% e 29,5% dos isolados resistentes ao clotrimazol (KATIRAEI; TEIFOORI; SOLTANI, 2015).

O clotrimazol parece ser um dos agentes mais eficazes para manejo em otomicose com taxa efetiva de 95-100%, sua escolha é justificada pelo fato de apresentar uma fraca atividade bacteriana, sendo vantajosa sua utilização quando se trata de infecções tópicas de origem mista, bacterianas-fúngicas. Além disso, o clotrimazol não possui efeitos ototóxicos relatados e está

disponível em pó, loção e solução (EDWARD; IRFANDY, 2012). No entanto, resultados apresentados recentemente por Mofatteh e colaboradores (2018) mostraram que, aproximadamente, 30% dos pacientes com otomicose tratados com clotrimazol por vinte dias não obtiveram resolução dos sintomas apresentados.

O crescente número de linhagens de organismos fúngicos resistentes aos azóis está relacionado ao uso indiscriminado dessa classe de fármacos, principalmente, as espécies pertencentes ao gênero *Candida*. Os principais mecanismos envolvidos na resistência frente aos azóis está a indução de bombas de efluxo pelos genes *CDR* e *MDR*, causando a diminuição intracelular da concentração desses fármacos, necessária para produzir o efeito desejado. Mutações no gene *ERG11*, promovendo alteração na enzima alvo desses fármacos, por alteração do sítio de ligação da molécula. Alterações no gene *ERG11p* provocando um aumento da síntese da enzima 14- α -esterol desmetilase, enzima esta que é inibida pela ação desses antifúngicos. E por fim, substituição do ergosterol pelo fecosterol, resultado de mutações no gene *ERG3*, ocasionando uma anulação dos efeitos perturbadores dos azóis sobre a membrana fúngica (KANAFANI; PERFECT, 2008; POSTERARO et al., 2017).

Em oposição ao perfil antifúngico demonstrados pelo clotrimazol, o ácido bórico teve a CIM determinada para 11 cepas entre a totalidade. A concentração de 1.024 $\mu\text{g/mL}$ inibiu o crescimento de 79% das amostras utilizadas. Os isolados de *C. tropicalis* foram os que apresentaram menor sensibilidade ao antisséptico. De forma geral, o ácido inorgânico utilizado teve melhor atividade contra os micro-organismos quando comparado ao antifúngico utilizado no estudo (Tabela 1, p. 39).

O número de estudos publicados com avaliação da atividade *in vitro* do ácido bórico contra espécies *Candida* é limitada, além disso torna-se difícil uma avaliação comparativa entre os resultados devido à falta de padronização para os ensaios de avaliação da atividade antifúngica, visto que fatores como meio de solubilização, tempo de leitura, meio nutriente utilizado e técnica utilizada influenciam nos resultados obtidos (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016; BONA et al., 2014). Entretanto, a determinação da atividade antifúngica do ácido bórico por De Seta e colaboradores (2009) contra 71 isolados de *C. albicans*, sensíveis (46 isolados) e resistentes (25 isolados) ao fluconazol, mostrou que a concentração de 1.563 $\mu\text{g/mL}$ do ácido inibiu o crescimento, respectivamente, de 27 isolados e de 2 isolados.

A literatura científica relata que o ácido bórico é uma opção alternativa de tratamento seguro e eficaz para infecções bacterianas, fúngicas e protozoárias superficiais do olho, ouvido e vagina (IAVAZZO et al., 2011; ROMSAITHONG, et al., 2016). Logo, o tratamento de tais infecções fúngicas com preparações de ácido bórico, geralmente, pode ser falho em indivíduos com comprometimento do sistema imunológico e com capacidade regenerativa de tecidos limitada, sendo necessária uma farmacoterapia de antifúngicos convencionais (FRAGA-SILVA et al., 2015; OZ; OZ, 2017).

Os valores da CFM apresentados pelo α -pineno frente as espécies *C. albicans* e *C. parapsilosis* podem ser vistos na Tabela 2. A CFM variou entre 64 ou 128 $\mu\text{g/mL}$. Desta forma, o monoterpene apresentou atividade fungicida, logo a razão CFM/CIM não foi superior a 2:1 em nenhuma das cepas testadas.

Tabela 2 – Concentração Fungicida Mínima ($\mu\text{g/mL}$) do α -pineno contra *C. albicans* e *C. parapsilosis*.

Cepas	α -pineno	
	CFM	CFM/CIM
<i>C. albicans</i>		
LM-19	128	1
LM-133	128	1
LM-77	128	1
LM-701	128	1
LM-18	128	1
ATCC® 60193™	128	2
<i>C. parapsilosis</i>		
LM-87	128	2
LM-20	64	1
LM-107	64	1
ATCC® 22019™	64	1

Fonte: Elaborada pelo autor.

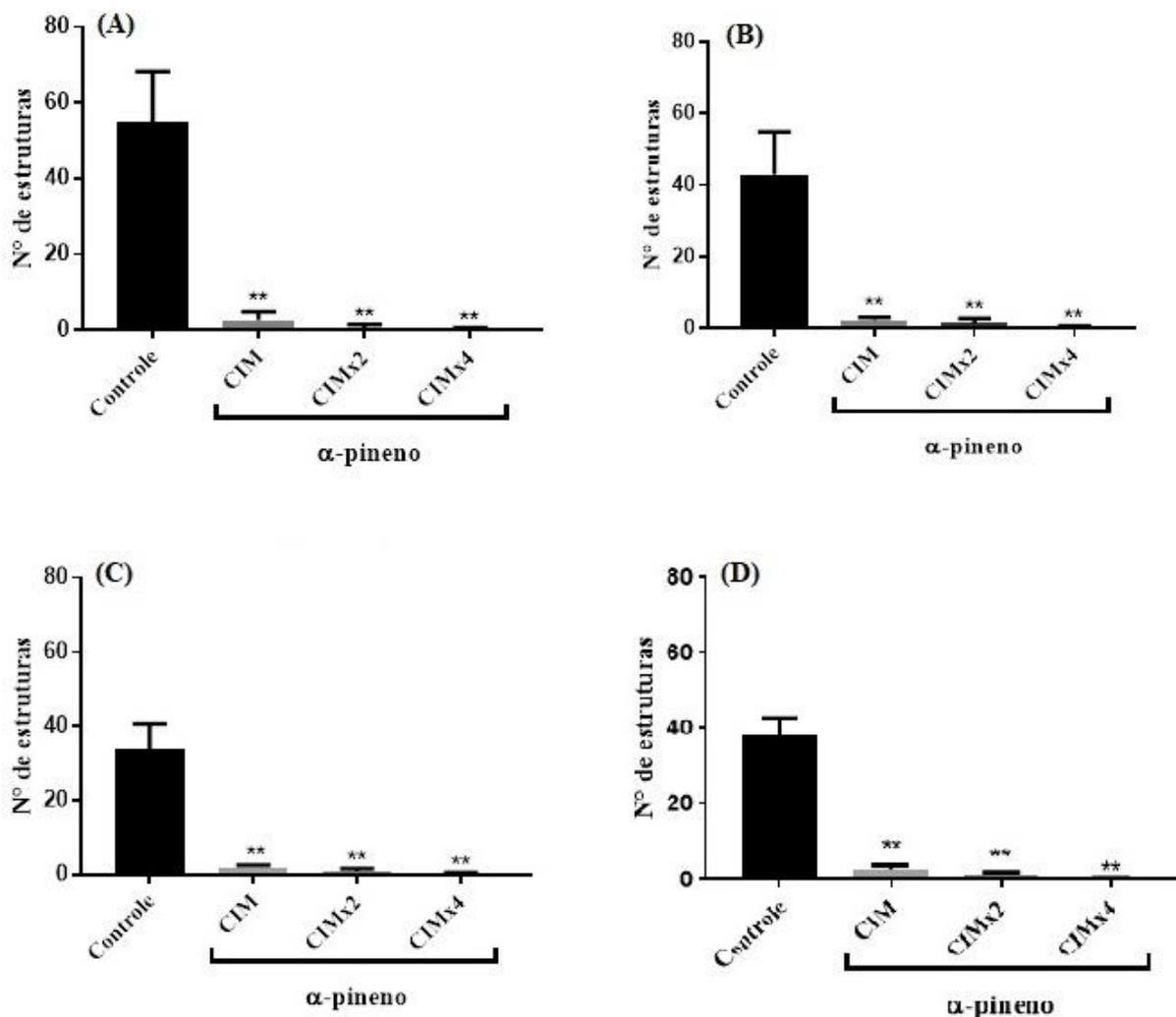
De acordo com os achados de Silva e colaboradores (2012^b) acredita-se que o α -pineno possua atividade fungicida, uma vez que a CIM do fitoconstituente foi capaz de eliminar totalmente a cepa *C. albicans* ATCC 10231 após 60 minutos de interação.

Não foi realizada a determinação da CFM para o clotrimazol e ácido bórico devido a CIM ter ocorrido na concentração de 1.024 µg/mL ou pela inatividade dos produtos. Uma vez que, para determinação da CFM são necessárias concentrações superiores e inferiores a CIM, o que inviabilizou a realização do ensaio.

5.2 EFEITO DO α -PINENO SOBRE A MICROMORFOLOGIA

As avaliações micromorfológicas de *C. albicans* ATCC[®] 60193[™] e LM-19; e *C. parapsilosis* ATCC[®] 22019[™] e LM-87 por microscopia óptica podem ser observadas na Figura 10. Na ausência do α -pineno os resultados revelaram crescimento característico de leveduras pertencente ao gênero *Candida*, apresentando estruturas fúngicas como blastoconídios e pseudo-hifas. Logo, na presença do fitoconstituente na CIM, CIMx2 e CIMx4 correspondente a cada cepa foi observado diminuição expressiva de características microscópicas desses microorganismos. Além disso, os achados desse trabalho indicam que a ausência de estruturas não depende do aumento da concentração do monoterpene, uma vez que os efeitos provocados pela CIM, CIMx2 e CIMx4 não apresentaram diferença significativa. Portanto, esses resultados corroboram com a capacidade de o fitoconstituente ter considerável atividade fungicida.

Figura 10 - Efeito do α -pineno na micromorfologia de espécies de *Candida*. (A) *C. albicans* ATCC® 60193™. (B) *C. albicans* LM-19. (C) *C. parapsilosis* ATCC® 22019™. (D) *C. parapsilosis* LM-87. ** Comparação com o controle (P < 0,05). Teste Mann-Whitney.



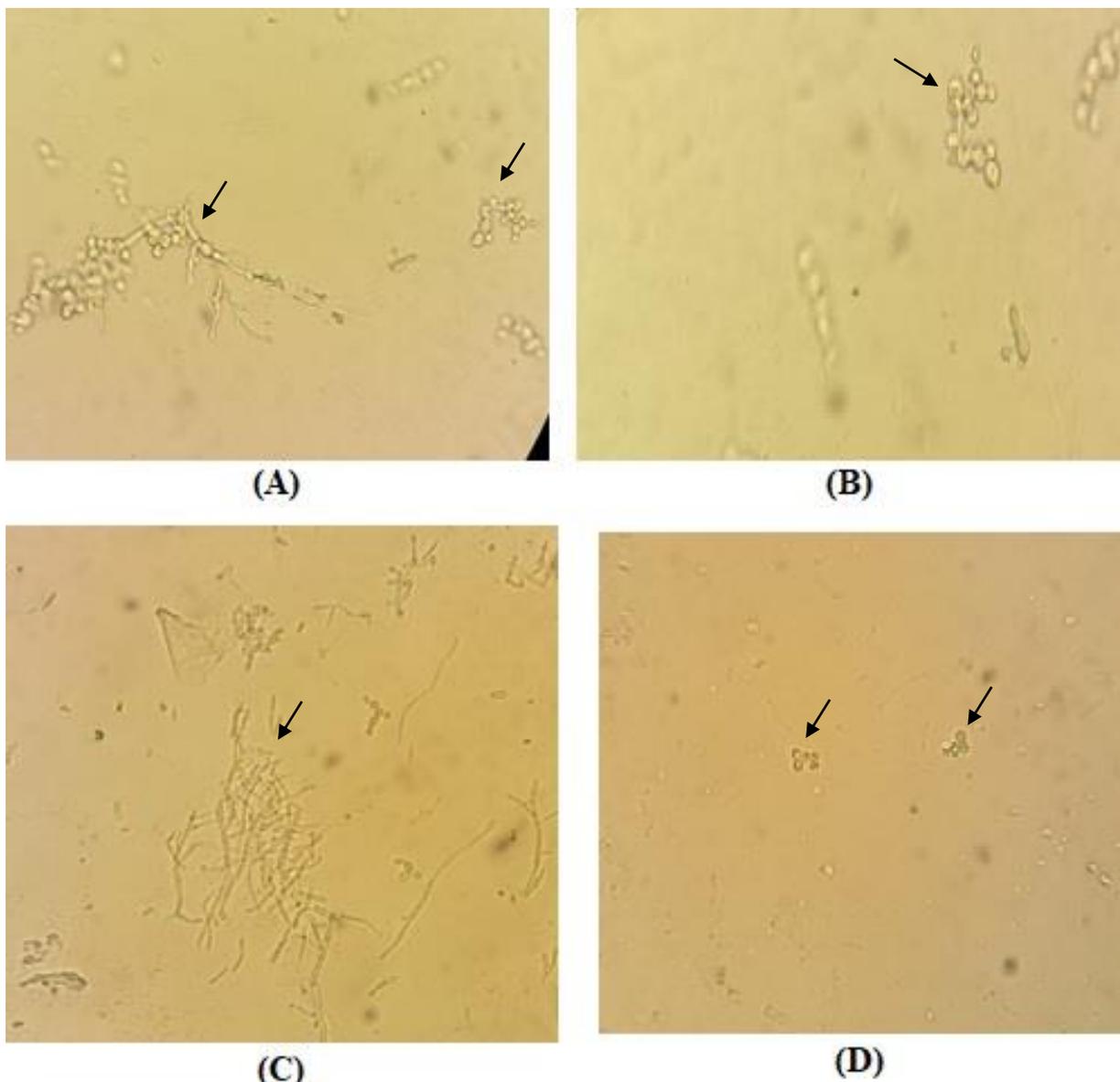
Fonte: Elaborada pelo autor.

A literatura sugere que a prevenção da transição morfológica entre leveduras a pseudo-hifas facilitaria o papel do sistema imunológico, sendo uma estratégia vantajosa para o controle de infecções causadas por *C. albicans*. Tal estratégia preservaria a integridade do microbioma fúngico, em vez de eliminar totalmente sua colonização. Dessa forma, a espécie se manteria no seu estado comensal (JACOBSEN et al., 2012; POINTER; BOYER; SCHMIDT, 2015).

É possível observar qualitativamente na Figura 11, que estruturas microscópicas fúngicas foram observadas em ambas espécies (*C. albicans* e *C. parapsilosis*) quando ensaiadas na ausência do α -pineno. Contudo, após cultivadas na exposição da CIM do fitoconstituente, as

cepas alteraram o perfil de estruturas fúngicas desenvolvidas, observando ausência de pseudo-hifas e número consideravelmente reduzido de blastoconídeos.

Figura 11 - Micromorfologia. (A) *C. albicans* ATCC® 60193™ na ausência do α -pineno. (B) *C. albicans* ATCC® 60193™ na CIM do fitoconstituente. (C) *C. parapsilosis* ATCC® 22019™ na ausência do monoterpene. (D) *C. parapsilosis* ATCC® 22019™ na CIM do α -pineno.



Legenda: → : estruturas celulares fúngicas – blastoconídeos e pseudo-hifas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Esses achados são considerados significativos por demonstrarem a capacidade de inibição do processo de transição morfológica de levedura para pseudo-hifas, por se tratar de um dos principais fatores de virulência apresentado por este gênero, responsável pela

penetração e invasão de tecidos, dificultando o processo de defesa dos macrófagos, o que torna o tratamento antifúngico ineficiente, levando a infecções fúngicas persistentes (BRITO et al., 2015; SANTOS et al., 2018). Por essa razão, pesquisas futuras são necessárias para entender os processos bioquímicos e genéticos envolvidos na inibição da formação de pseudo-hifas causada pelo α -pineno em espécies de *Candida*.

5.3 ENSAIO CHECKERBOARD

Os resultados obtidos na combinação entre o α -pineno e o ácido bórico contra cepas de *C. albicans* e *C. parapsilosis* estão mostrados na Tabela 3. O α -pineno foi capaz de reduzir todas as CIMs do ácido bórico quando associados, em comparação aos valores correspondentes da CIM individual. No entanto, o efeito sinérgico não foi produzido em nenhuma combinação. A interação entre o fitoconstituente e o ácido bórico produziu apenas um tipo de efeito em todas as associações, a aditividade. Os melhores resultados da combinação foram vistos frente a espécie *C. parapsilosis*.

Tabela 3 – Estudo da combinação entre α -pineno e ácido bórico contra espécies de *Candida*.

Cepas	CIM na combinação		CIF		ICIF	Resultado
	α -pineno	ácido bórico	α -pineno	ácido bórico		
<i>C. albicans</i> LM-19	16	512	0,125	0,5	0,625	Aditividade
<i>C. albicans</i> ATCC® 60193™	8	512	0,125	0,5	0,625	Aditividade
<i>C. parapsilosis</i> LM-87	16	512	0,25	0,5	0,75	Aditividade
<i>C. parapsilosis</i> ATCC® 22019™	32	256	0,5	0,25	0,75	Aditividade

Fonte: Elaborada pelo autor.

Uma estratégia promissora para combater micro-organismos resistentes e aumentar a eficácia dos medicamentos atualmente utilizados é a terapia combinada. Além disso, a combinação de fármacos ou substâncias pode retardar a evolução do surgimento de mecanismos de resistência. Por essas razões, os estudos de combinações de compostos para tratar patógenos

fúngicos acumulou, consideravelmente, interesse nos últimos anos (HILL; COWEN, 2015; BAYM; STONE; KISHONY, 2016).

Combinações de agentes ativos contra espécies de *Candida* podem revelar-se mais úteis como agentes antifúngicos do que fármacos utilizados isoladamente. Portanto, algumas substâncias naturais são investigadas quanto ao sinergismo com azóis, polienos ou equinocandinas hoje usados no manejo da infecção por *Candida* (ZIDA et al., 2017). Apesar de ainda não haver estudos da atividade antifúngica do α -pineno contra espécies de *Candida* isoladas de otomicose, principalmente a respeito da terapia combinada com outras substâncias ou antifúngicos, os resultados descobertos nesse estudo mostram-se promissores, uma vez que a associação do monoterpene ao antisséptico não apresentou efeitos antagônicos.

Os resultados interpretados nesse estudo somam-se aos apresentados por Silva e colaboradores (2012^b), que avaliaram a atividade do enantiômero (+)- α -pineno associado a anfotericina B contra *C. albicans*, obtiveram ICIF igual a 0,62, com efeito indiferente ou aditivo da associação.

O efeito aditivo, apresentado em estudos de associação, é caracterizado pela capacidade de duas ou mais substâncias combinadas atuarem em estágios diferentes pela via biológica ou até mesmo sobre a mesma proteína, aumentando a eficácia farmacêutica. Geralmente, essas combinações permitem maiores efeitos ou menor toxicidade devido a administração de doses únicas mais baixas (PEREA et al., 2002; SPITZER; ROBBINS; WRIGHT, 2017).

6 CONCLUSÕES

Os resultados demonstraram significativa atividade antifúngica do α -pineno frente as leveduras de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* isoladas de pacientes com otomicose. Além disso, o fitoconstituente apresentou valores notáveis da relação entre sua CIM e CFM, caracterizando o composto com atividade fungicida contra as espécies testadas. Ao mesmo tempo em que promoveu alterações significativas, quantitativas e qualitativas, na morfologia das espécies de *C. albicans* e *C. parapsilosis*, comprovando seu potencial efeito antifúngico. Esses achados são importantes, pois fornecem expectativas mais claras para estudos farmacológicos futuros, para avaliação toxicológica, possíveis aplicações terapêuticas, mecanismos de ação envolvidos, capacidade de reversão de mecanismos de resistência, e estudos de eficácia para assegurar, assim, seu uso *in vivo*.

Outro aspecto importante determinado nesse trabalho, foi o perfil de atividade do clotrimazol contra as cepas utilizadas. Essa é uma informação importante, pois determina o perfil de sensibilidade destes isolados clínicos frente aos antifúngicos utilizados no tratamento de otomicose. Uma vez que, o fármaco padrão escolhido não apresentou atividade contra as cepas ensaiadas. Comportamento oposto foi observado para o composto antisséptico, ácido bórico, que apresentou atividade antifúngica considerável, justificando, assim, seu uso clínico. Entretanto, pesquisas devem ser realizadas para avaliar o seu perfil toxicológico, como também os possíveis mecanismos de ação envolvidos.

O ensaio de associação entre o monoterpene e o ácido bórico mostrou que atividade sinérgica não foi produzida na combinação, no entanto a atividade aditiva produzida nos ensaios surge como uma possível opção terapêutica a não ser descartada, com o objetivo de diminuir a exposição do indivíduo a fármacos antifúngicos. Além disso, esse manejo poderá reduzir o surgimento de cepas resistentes aos antifúngicos azóis. Vale destacar ainda que não foi observado efeito antagônico na associação do fitoconstituente com o antisséptico.

Os dados obtidos no presente trabalho reforçam a importância do monoterpene α -pineno como notável composto antifúngico e estimulam sucessivas pesquisas no intuito de viabilizar sua inserção na terapêutica tradicional, otimizando as estratégias farmacológicas contra otomicose.

REFERÊNCIAS

ABDELAZEEM, M.; GAMEA, A.; MUBARAK, H.; ELZAWAWY, N. Epidemiology, causative agents, and risk factors affecting human otomycosis infections. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 45, n. 4, p. 820-826, 2015.

AGARWAL, P.; DEVI, L. S. Otomycosis in a rural community attending a tertiary care hospital: assessment of risk factors and identification of fungal and bacterial agents. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 11, n. 6, p. DC14-DC18, 2017.

ALARID-CORONEL, J.; CELIS-AGUILAR, E.; ESCOBAR-AISPURO, L.; MUÑOZ-ESTRADA, V. Otomycosis in immunocompetent patients: clinical and mycological features. Our experience with 40 cases. **Clinical Otolaryngology**, v. 43, n. 1, p. 373-377, 2018.

ALI, K.; HAMED, A. M.; HASSAN, H.; ESMAIL, A.; SHENEEF, A. Identification of fungal pathogens in otomycosis and their drug sensitivity: our experience. **International Archives of Otorhinolaryngology**, v. 22, n. 4, p. 400-403, 2018.

ALI; ELHAG; IBRAHIM. Etiology of otomycosis among patients attending Khartoum ear, Nose and Throat Teaching Hospital. **African Journal of Medical Sciences**, v. 3, n. 1, p. 1-6, 2018.

ALVES, L. A.; FREIRES IDE, A.; PEREIRA, T. M.; DE SOUZA, A.; LIMA E. O.; DE CASTRO, R. D. Effect of *Schinus terebinthifolius* on *Candida albicans* growth kinetics, cell wall formation and micromorphology. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 71, n. 3/4, p. 965-971, 2013.

AMORATI, R.; FOTI, M. C.; VALGIMIGLI, L. Antioxidant activity of essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 46, p. 10835-10847, 2013.

ANEJA, K. R.; SHARMA, C.; JOSHI, R. Fungal infection of the ear: a common problem in the north eastern part of Haryana. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 74, n. 6, p. 604-607, 2010.

ANON. Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods. In: ISENBERG, H. D. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. **Washington: American Society for Microbiology**, p. 5.16.1-5.16.23, 1992.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils-a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: a review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 2, p. 71-79, 2016.

BARATI, B.; OKHOVVAT, S. A. R.; GOLJANIAN, A.; OMRANI, M. R. Otomycosis in central iran: a clinical and mycological study. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, v. 13, n. 12, p. 873-876, 2011.

BAYM, M. STONE, L. K.; KISHONY, R. Multidrug evolution-ary strategies to reverse antibiotic resistance. **Science**, v. 351, n. 6268, jan. 2016. Disponível em: [https://10.1126/science.aad3292](https://doi.org/10.1126/science.aad3292). Acesso em: 11 dez. 2018.

BHALLY, H. S.; SHIELDS, C.; LIN, S. Y.; MERZ, W. G. Otitis caused by *Scedosporium apiospermum* in an immunocompetent child. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 68, n. 7, p. 975-978, 2004.

BONA, M. A. E.; PINTO, S. G. F.; FRUET, K. T.; JORGE, M. C. T.; MOURA, C. A. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, p. 218-225, 2014.

BONAPACE, R. C.; BOSSO, A. J.; FRIEDRICH, V. L.; WHITE, L. R. Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 44, n. 4, p. 363-366, 2002.

BRITO, D. I. V.; MORAIS-BRAGA, M. F. B.; CUNHA, F. A. B.; ALBUQUERQUE, R. S.; CARNEIRO, J. N. P.; LIMA, M. S. F.; LEITE, N. F.; SOUZA, C. E.S.; ANDRADE, J. C.; ALENCAR, L. B. B.; LAVOR, A. K. L. S.; FIGUEREDO, F. G.; LIMA, L. F.; COUTINHO, H. D. M. Análise fitoquímica e atividade antifúngica do óleo essencial de folhas de *Lippia sidoides* Cham. e do Timol contra cepas de *Candida* spp. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 836-844, 2015. Supl. 2.

BROWN, G. D.; DENNING, D. W.; LEVITZ, S. M. Tackling human fungal infections. **Science**, v. 336, n. 6082, p. 647-647, 2012.

BROWN, G. D.; DENNING, D. W.; GOW, N. A.; LEVITZ, S. M.; NETEA, M. G.; WHITE, T. C. Hidden killers: human fungal infections. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 165, p. 165rv13, 2012.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, A. B.; KNOLLMANN, C. B. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012.

CAMPOY, S.; ADRIO, L. J. Antifungals. **Biochemical Pharmacology**, v. 133, n. 1, p. 86-96, 2017.

CHAPPE, M.; VRIGNAUD, S.; DE GENTILE, L.; LEGRAND, G.; LAGARCE, F.; LE GOVIC, Y. Successful treatment of a recurrent *Aspergillus niger* otomycosis with local application of voriconazole. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 28, n. 2, p. 396-398, 2018.

CHAVES, G. M.; SANTOS, F. P.; COLOMBO, A. L. The persistence of multifocal colonization by a single ABC genotype of *Candida albicans* may predict the transition from commensalism to infection. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 2, p. 198-204, 2012.

CHAVES, G. M.; DINIZ, M. G.; DA SILVA-ROCHA, W. P.; DE SOUZA, L. B.; GONDIM, L. A.; FERREIRA, M. A.; SVIDZINSKI, T. I.; MILAN, E. P. Species distribution and virulence factors of *Candida* spp. isolated from the oral cavity of kidney transplant recipients in Brazil. **Mycopathologia**, v. 175, n. 3-4, p. 255-263, 2013.

CHERAGHSAHAR, S.; KAZEMI, S.; BIRJANDI, M.; YARAHMADI, M.; MAHMOUDI, S.; MOHAMMADI, R.; SEPAHVAND, A. Otomycosis in western Iran: clinical and mycological aspects. **Iranian Journal of Clinical Infectious Diseases**, v. 12, n. 2, p. 1-5, 2017.

CHITTKA, L.; BROCKMANN, A. Perception Space – The Final Frontier. **PLoS Biology**, v. 3, n. 4, p. 564-568, 2005.

CLEELAND, L.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and experimental animal infections. In: LORIAN, V. M. D. Antibiotics in Laboratory Medicine. **New York: Williams & Wilkins**, p. 739-788, 1991.

CLSI. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**. 4. Ed. CLSI standard M27. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.

CORREA-ROYERO, J.; TANGARIFE, V.; DURÁN, C.; STASHENKO, E.; MESA-ARANGO, A. *In vitro* antifungal activity and cytotoxic effect of essential oils and extracts of medicinal and aromatic plants against *Candida krusei* and *Aspergillus fumigatus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 734-741, 2010.

COSTA, F. M. C. M.; SILVA, G. A.; SILVA, S. P. A.; LIMA, M. L. V.; BEZERRA-SILVA, C. P.; ROCHA, L. K. S.; NAVARRO, F. A. M. D.; CORREIA, S. T. M.; NAPOLEÃO, H. T.; SILVA, V. M.; PAIVA, G. M. P. Essential oils from leaves of medicinal plants of brazilian flora: chemical composition and activity against *Candida* Species. **Medicines**, v. 4, n. 27, p. 1-8, 2017.

CROWLEY, P. D.; GALLAGHER, H. C. Clotrimazole as a pharmaceutical: past, present and future. **Journal of Applied Microbiology**, v. 117, n. 13, p. 611-617, 2014.

DE SETA, F.; SCHMIDT, M.; ESSMANN, M.; LARSEN, B. Antifungal mechanisms supporting boric acid therapy of *Candida* vaginitis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 2, p. 325-336, 2009.

DE SETA, F.; HUNTER, M.; LARSEN, B. *In vitro* evaluation of small molecule inhibitors and probiotic by products on growth and viability of vaginal microorganisms. **British Journal of Medicine and Medical Research**, v. 4, n. 36, p. 5779-5792, 2014.

DEWICK, P. M. The biosynthesis of C 5-C 25 terpenoid compounds. **Natural Product Reports**, v. 14, n. 2, p. 114-144, 1997

DHINGRA, P. L.; DHINGRA, S. **Disease of Ear, Nose and Throat-E-Book**. 6. ed. Elsevier: New Delhi, 2014.

EDUARDO, S. L.; FARIAS, C. T.; FERREIRA, B. S.; FERREIRA, B. P.; LIMA, N. Z.; FERREIRA, B. S. Antibacterial activity and time-kill kinetics of positive enantiomer of α -pinene against strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 11, p. 917-924, 2018.

EDWARD, Y.; IRFANDY, D. Otomycosis. **Jurnal Kesehatan Andalas**, v. 1, n. 2, p. 101-106, 2012.

FENGFENG, W.; YAMEI, J.; XUEMING, X.; NA, Y. Electrofluidic pretreatment for enhancing essential oil extraction from citrus fruit peel waste. **Journal of Cleaner Production**, v. 159, n. 1, p. 85-94, 2017.

FRAGA-SILVA, T. F.; MARCHETTI, C. M.; MIMURA, L. A.; LOCACHEVIC, G. A.; GOLIM, M. A.; VENTURINI, J.; ARRUDA, M. S. Relationship among short and long term of hypoinsulinemia-hyperglycemia, dermatophytosis, and immunobiology of mononuclear phagocytes. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, n. 1, p. 1-10, 2015.

FREIRE, P. *Pedagogia da indignação: cartas pedagógicas e outros escritos*. São Paulo: UNESP, 2014.

GHARAGHANI, M.; SEIFI, Z.; MAHMOUDABADI, Z. A. Otomycosis in Iran: a review. **Mycopathologia**, v. 179, n. 5-6, p. 415-424, 2015.

GIACOMAZZI, J.; BAETHGEN, L.; CARNEIRO, C. L.; MILLINGTON, A. M.; DENNING, W. D.; COLOMBO, L. A.; PASQUALOTTO, C. A. The burden of serious fungal infections in Brazil. *Mycoses*, v. 59, n. 3, p. 145-450, 2016.

GOVINDARAJAN, M.; RAJESWARY, M.; HOTI, S. L.; BHATTACHARYYA, A.; BENELLI, G. Eugenol, α -pinene and β -caryophyllene from *Plectranthus barbatus* essential oil as eco-friendly larvicides against malária, dengue and *Japanese encephalitis* mosquito vectors. **Parasitology Research**, v. 115, n. 2, p. 807-815, 2016.

GUITTEREZ, P. H.; ALVAREZ, S. J.; SANUDO G.; GARCÍA, G.; RAMOS SÁNCHEZ, C.; VALLEJO VALDEZATE, L. A. Presumed diagnosis: otomycosis. A study 451 patients. **Acta Otorrinolaringológica Española**, v. 56, n. 5, p. 181-186, 2005.

HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical Analysis**, v. 11, n. 3, p. 137-147, 2000.

HAJA, N. A.; SHAIK, M. K.; SIVA, P. R. S. Mycology of otomycosis in a tertiary care teaching hospital. **Journal of Research in Medical and Dental Science**, v. 3, n. 1, p. 27-30, 2017.

HIM, A.; OZBEK, H.; TUREL, I.; ONER, C. A. Antinociceptive activity of alpha-pinene and fenchone. **PharmacologyOnline**, v. 3, p. 363-369, 2008.

I VAZZO, C.; GKEGKES, I. D.; ZARKADA, I. M.; FALAGAS, M. E. Boric acid for recurrent vulvovaginal candidiasis: the clinical evidence. **Journal of Women's Health**, v. 20, n. 8, p. 1245-1255, 2011.

HAGIWARA, S.; TAMURA, T.; SATOH, K.; KAMEWADA, H.; NAKANO, M.; SHINDEN, S.; YAMAGUCHI, H.; MAKIMURA, K. The molecular and antifungal susceptibilities of *Aspergillus* species causing otomycosis in Tochigi, Japan. **Mycopathologia**, Kaga, out. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11046-018-0299-9>. Acesso em: 18 dez. 2018.

HAMZA, A. M. I. R.; KHAN, Q.; KHAN, M. Efficacy of topical clotrimazole in otomycosis. **Pakistan Journal of Medical & Health Sciences**, v. 5, n. 4, p. 738-740, 2011.

HILL, J. A.; COWEN, L. E. Using combination therapy to thwart drug resistance. **Future Microbiol**, v. 10, n. 11, p. 1719-1726, 2015.

HO, T.; VRABEC, J. T.; YOO, D.; COKER, N. J. Otomycosis: clinical features and treatment implications. **Otolaryngology-Head and Neck Surgery**, v. 135, n. 5, p. 787-791, 2006.

HOLETZ, B. F.; PESSINI, L. G.; SANCHES, R. N.; CORTEZ, G. A. D.; NAKAMURA, V. C.; DIAS, P. B. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HOOD, J. R.; WILKINSON, J. M.; CAVANAGH, H. M. A. Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research. **Journal Essential Oil Research**, v. 15, n. 6, p. 428-433, 2003.

HOOG G. S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; AHMED, S.; AL-HATMI, A. M. S.; FIGUERAS, M. J.; VITALE, R. G. **Atlas of Clinic fungi**. Virgili: Central Bureau Yoor Shimmel Cultures, 2001.

HOUGHTON, P. J.; HOWES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 3, p. 391-400, 2007.

IKEI, H.; SONG, C.; MIYAZAKI, Y. Effects of olfactory stimulation by α -pinene on autonomic nervous activity. **Journal of Wood Science**, v. 62, n. 6, p. 568-572, 2016.

JIANG, Y.; WU, N.; FU, Y.; WANG, W.; LUO, M.; ZHAO, C.; ZU, Y.; LIU, X. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Rosemary*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 32, n. 1, p. 63-68, 2011.

JUCÁ, Matthews Davi. **Propriedades farmacológicas dos monoterpenos - e β -pineno no músculo liso gastrointestinal de ratos: efeito miorreaxante e pró-cinético**. 2007. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará – UFC, Fortaleza, 2007. f. 89.

KARTHIKEYAN, R.; KANIMOZHI, G.; PRASAD, N. R.; AGILAN, B.; GANESAN, M.; SRITHA, G. Alpha pinene modulates UVA-induced oxidative stress, DNA damage and apoptosis in human skin epidermal keratinocytes. **Life Sciences**, v. 212, p. 150-158, 2018.

KATIRAEI, F.; TEIFOORI, F.; SOLTANI, M. Emergence of azole-resistant *Candida* species in AIDS patients with oropharyngeal candidiasis in Iran. **Current Medical Mycology**, v. 1, n. 3, p. 11-16, 2015.

KAZEMI, A.; MAJIDINIA, M.; JAAFARI, A.; MOUSAVI, S. A. A.; MAHMOUDABADI, A. Z.; ALIKHAH, H. Etiologic agents of otomycosis in the North-western area of Iran. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 21776, 2015.

KIM, D. S.; LEE, H. J.; JEON, Y. D.; HAN, Y. H.; KEE, J. Y.; KIM, H. J.; SHIN, H. J.; KANG, J.; LEE, B. S.; KIM, S. H.; KIM, S. J.; PARK, S. H.; CHOI, B. M.; PARK, S. J.; UM, J. Y.; KUMAR, R.; KUMAR, C.; KUMAR, S. Clinical and microbial study of otomycosis. **International Journal of Medical and Health Research**. v. 3, n. 1, p. 118-119, 2017.

KUMAR, R.; KUMAR, C.; KUMAR, S. Clinical and microbial study of otomycosis. **International Journal of Medical and Health Research**. v. 3, n. 1, p. 118-119, 2017.

KUMARAN, S. S.; KAVITHA, M. A prospective non-randomised observational case study-the study of otomycosis. **Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences**, v. 6, n. 12, p. 931-935, 2017.

LAHLOU, M. Screening of natural products for drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 2, n. 5, p. 697-705, 2007.

LEWIS, R. E.; DIEKEMA, D. J.; MESSER, S. A.; PFALLER, M. A.; KLEPSE, M. E. Comparison of Etest, checkerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy

or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 345-351, 2002.

LIMA, I. O.; DE ARAÚJO, G. O. R.; LIMA, E. O.; DE SOUZA, E. L.; FARIAS, N. P.; DE FÁTIMA, N. D. Inhibitory effect of some phytochemicals in the growth of yeasts potentially causing opportunistic infections. **Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 199-203, 2005.

LOOCK, J. W. A randomised controlled trial of active chronic otitis media comparing courses of eardrops versus one-off topical treatments suitable for primary, secondary and tertiary health-care settings. **Clinical Otolaryngology**, v. 37, n. 4, p. 261-270, 2012.

MIRON, D.; BATTISTI, F.; SILVA, K. F.; LANA, D. A.; PIPPI, B.; CASANOVA, B.; GNOATTO, S.; FUENTEFRÍA, A.; MAYORGA, P.; SCHAPOVAL, S. E. E. Antifungal activity and mechanism of action of monoterpenes against dermatophytes and yeasts. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 24, n. 6, p. 660-667, 2014.

MOFATTEH, R. M.; YAZDI, N. Z.; YOUSEFI, M.; NAMAIEI, H. M. Comparison of the recovery rate of otomycosis using betadine and clotrimazol topical treatment. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 84, n. 4, p. 404-409, 2018.

MUNGUÍA, R.; DANIEL, S. J. Otological antifungals otomycosis: a review. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 72, n. 4, p. 453-459, 2008.

NAEINI, A.; NADERI, J. N.; SHOKRI, H. Analysis and in vitro anti-*Candida* antifungal activity of *Cuminum cyminum* and *Salvadora persica* herbs extracts against pathogenic *Candida* strains. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 24, n. 1, p. 13-18, 2014.

NASCIMENTO JÚNIOR, B. J.; TÍNEL, L. O.; SILVA, E. S.; RODRIGUES, L. A.; FREITAS, T. O. N.; NUNES, X. P.; AMORIM, E. L. C. Avaliação do conhecimento e percepção dos profissionais da estratégia de saúde da família sobre o uso de plantas medicinais e fitoterapia em Petrolina-PE, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1, p. 57-66, 2016.

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; COPPOLA, R.; DE FEO, V. Essential oils and antifungal activity. **Pharmaceuticals**, v. 10, n. 86, p. 1-20, 2017.

NCUBE, N. S.; AFOLAYAN, A. J.; OKOH, A. I. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 12, p. 1797-1806, 2008.

OMRAN, M. S.; YOUSEFZADE, Z.; KHAFRI, S.; TAGHIZADEH-ARMAKI, M.; KIAKOJURI, K. Effect of combination therapy with ceftizoxime and clotrimazol in the treatment of otomycosis. **Current Medical Mycology**, v. 4, n. 1, p. 18-23, 2018.

OZ, Y.; QORAAN, I.; OZ, A.; BALTA, I. Prevalence and epidemiology of tinea pedis and toenail onychomycosis and antifungal susceptibility of the causative agents in patients with

type 2 diabetes in Turkey. **International Journal of Dermatology**, v. 56, n. 1, p. 68-74, 2017.

OZTÜRKCAN, S.; DUNDAR, R.; KATILMIS, H.; IIKNUR, A. E.; AKTAS, S.; HACIOMEROGLU, S. The ototoxic effect of boric acid solutions applied into the middle ear of guinea pigs. **European Archives Otorhinolaryngology**, v. 266, n. 5, p. 663-667, 2009.

PANCHAL, P.; PETHANI, J.; PATEL, D.; RATHOD, S.; SHAH, P. Analysis of various fungal agents in clinically suspected cases of otomycosis. **Indian Journal of Applied Research**, v.2, n. 8, p. 12-19, 2013.

PAULA, S. B.; BARTELLI, F. T.; RAIMO, V.; SANTOS, P. J.; MOREY, T. A.; BOSINI, A. M.; NAKAMURA, V. C.; YAMAUCHI, M. L.; YAMADA-OGATTA, F. S. Effect of eugenol on cell surface hydrophobicity, adhesion, and biofilm of *Candida tropicalis* and *Candida dubliniensis* isolated from oral cavity of HIV-infected patients. **Evidence-Based Complementary Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1-8, 2014.

PEREA, S.; GONZALEZ, G.; FOTHERGILL, A. W.; SUTTON, D. A.; RINALDI, M. G. *In vitro* activities of terbinafine in combination with fluconazole, itraconazole, voriconazole, and posaconazole against clinical isolates of *Candida glabrata* with decreased susceptibility to azoles. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 5, p. 1831-1833, 2002.

PEREIRA, P. S. S.; DE OLIVEIRA, M. H.; TURRINI, T. N. R.; LACERDA, A. R. Desinfecção com hipoclorito de sódio em superfícies ambientais hospitalares na redução de contaminação e prevenção de infecção: revisão sistemática. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 49, n. 4, p. 681-688, 2015.

POINTER, B. R.; BOYER, M. P.; SCHMIDT, M. Boric acid destabilizes the hyphal cytoskeleton and inhibits invasive growth of *Candida albicans*. **Yeast**, v. 32, n. 4, p. 389-298, 2015.

PONTES, S. V. B. Z.; SILVA, F. D. A.; LIMA, O. E.; GUERRA, H. M.; OLIVEIRA, C. M. N.; CARVALHO, P. F. F. M.; GUERRA, Q. S. F. Otomycosis: a retrospective study, v. 75, n. 3, p. 367-370, 2009.

POSER, G. L. V.; MENTZ, L. A. Diversidade biológica e sistemas de classificação. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS/UFSC, 2004. Cap. 4, p. 75-89.

POSTERARO, B.; VELLA, A.; DE CAROLIS, E.; SANGUINETTI, M. Molecular detection of resistance to azole components. **Methods in Molecular Biology**, v. 1508, p. 423-435, 2017.

RATHOD, S. B. J.; KUMAR, D. S. K.; KHABEER, A. A.; CHANDER, P. B. C.; BHUSHAN, P. I.; ABHINAV, T.; KUMAR, D. V.; RAO, H. S. V. A. Efficacy of topical ketoconazole in management of otomycosis and its outcome-A clinical study of 100 cases. **Journal of Evidence Based Medicine and Healthcare**, v. 4, n. 52, p. 3185-3189, 2017.

RAVINDRAN, A.; SAGESH, M. Effectiveness of oral itraconazole in the management of otomycosis with tympanic membrane perforation. **International Journal of Research in Medical Sciences**, v. 5, n. 4, p. 1373-1376, 2017.

RIVERA-YANEZ, R. C.; TERRAZAS, I. L.; JIMENEZ-ESTRADA, M.; CAMPOS, E. J.; FLORES-ORTIZ, M. C.; HERNANDEZ, B. L.; CRUZ-SANCHEZ, T.; GARRIDO-FARINA, I. G.; RODRIGUEZ-MONROY, A. M.; CANALES-MARTINEZ, M. M. Anti-*Candida* activity of *Bursera morelensis* Ramirez essential oil and two compounds, α -pinene and γ -terpinene - An *in vitro* study. **Molecules**, v. 22, n. 2095, p. 1-13, 2017.

RODRIGUES, C. F.; SILVA, S.; HENRIQUES, M. *Candida glabrata*: A review of its features and resistance. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 33, n. 5, p. 673-688, 2014.

ROMSAITHONG, S.; TOMANAKAN, K.; TANGSAWAD, W.; THANAVIRATANANICH, S. Effectiveness of 3 percent boric acid in 70 percent alcohol versus 1 percent clotrimazole solution in otomycosis patients: a randomised, controlled trial. **The Journal of Laryngology & Otology**, v. 130, n. 9, p. 811-815, 2016.

SHARIFYNIA, S.; BADALI, H.; SHARIFI S. M.; SHIDFAR, M. R.; HADIAN, A.; SHAHROKHI, S.; GHANDCH, G.; REZAIIE, S. *In vitro* antifungal susceptibility profiles of *Candida albicans* complex isolated from patients with respiratory infections. **Acta Medica Iranica**, v. 54, n. 6, p. 376-381, 2016.

SALIHOGU, M.; DOGRU, S.; CESMECI, E.; CALISKAN, H.; KURT, O.; KUÇUKODACI, Z.; GUNGOR, A. Ototoxicity of boric acid powder in a rat animal model. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 84, n. 3, p. 332-337, 2017.

SANTOS, S. F. J.; ROCHA, E. J.; BEZERRA, F. C.; SILVA, N. K. M.; MATOS, S. L. M. Y.; FREITAS, S. T.; DOS SANTOS, L. T. A.; CRUZ, P. R.; MACHADO, T. J. A.; RODRIGUES, S. H. T.; BRITO, S. E.; SALES, L. D.; ALMEIDA, O. W.; COSTA, M. G. J.; COUTINHO, M. D. H.; MORAIS-BRAGA, B. F. M. Chemical composition, antifungal activity and potential anti-virulence evaluation of the *Eugenia uniflora* essential oil against *Candida* spp. **Food Chemistry**, v. 261, n. 1, p. 233-239, 2018.

SARDI, J. C. O.; SCORZONI, L.; BERNARDI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES, G. M. J. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 10-24, 2013.

SARTORATTO, A.; MACHADO, M. L. A.; DELARMELENA, C.; FIGUEIRA, M. G.; DUARTE, T. C. M.; REHDER, G. L. V. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 275-280, 2004.

SATISH, H. S.; VISWANATHA, B.; MANJULADEVI, M. A clinical study of otomycosis. **IOSR Journal of Dental and Medical Sciences**, v. 5, n. 2, p. 57-62, 2013.

SATOU, T.; KASUYA, H.; MAEDA, K.; KOIKE, K. Daily inhalation of alpha-pinene in mice: effects on behavior and organ accumulation. **Phytotherapy research**, v. 28, n. 9, p. 1284-1287, 2014.

SCHMIDT, M.; SCHAUMBERG, J. Z.; STEEN, C. M.; BOYER, M. P. Boric acid disturbs cell wall synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Microbiology**, v. 2010, p. 1-11, 2010.

SCHMIDT, M. Boric acid inhibition of *Trichophyton rubrum* growth and conidia formation. **Biological Trace Element Research**, v. 180, n. 2, p. 349-354, 2017.

SIDDIQUI, Z. N.; FAROOQ, F.; MUSTHAFI, T. N. M.; AHMAD, A.; KHAN, A. U. Synthesis: characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 17, n. 2, p. 237-243, 2013.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W.; AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 2, p. 288-305, 2012^a.

SILVA, R. C. A.; LOPES, P. M.; AZEVEDO, B. M. M.; COSTA, M. C. D.; ALVIANO, S. C.; ALVIANO, S. D. Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers. **Molecules**, v. 17, n. 6, p. 6305-6316, 2012^b.

SILVA, B. M.; SANTOS, R. C. R.; CUNHA, M. A.; VALENTINI, A.; PESSOA, L. D. O.; CAETANO, S. W. E.; FREIRE, N. V. Structural, electronic, and optical properties of bulk boric acid 2A and 3T polymorphs: experimental and density functional theory calculations. **Crystal Growth & Design**, v. 16, n. 11, p. 6631-6640, 2016.

SILVA, S.; RODRIGUES, F. C.; ARAÚJO, D.; RODRIGUES, E. M.; HENRIQUES, M. *Candida* species biofilms' antifungal resistance. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 1, p.1-17, 2017.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES et al (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFSC, 2010. Cap. 18, p. 475.

SPITZER, M.; ROBBINS, N.; WRIGHT, D. G. Combinatorial strategies for combating invasive fungal infections. **Virulence**, v. 8, n. 2, p. 169-185, 2017.

SULEYMAN, G.; ALANGADEN, G. J. Nosocomial fungal infections. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 4, p. 1023-1052, 2016.

SURANENI, V. R.; KAPILAVAYA, N.; RAYAPU, B. S.; KUDAMALA, S. Clinical and microbiological study of otomycosis. **Journal of Evidence Based Medicine Healthcare**, v. 4, n. 51, p. 3098-3102, 2017.

TABANCA, N.; DEMIRCI, B.; CROCKETT, S. L.; BASER, K. H.; WEDGE, D. E. Chemical composition and antifungal activity of *Arnica longifolia*, *Aster hesperius*, and *Chrysothamnus nauseosus* essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 21, p. 8430-8435, 2007.

TANGARIFE-CASTAÑO, V.; CORREA-ROYERO, J.; ZAPATA-LONDOÑO, B.; DURÁN, C.; STANSHENKO, E.; MESA-ARANGO, A.C. Anti-*Candida albicans* activity, cytotoxicity and interaction with antifungal drugs of essential oils and extracts from aromatic and medicinal plants. **Infectio**, v. 15, n. 1, p. 160-167, 2011.

WHITE, R. L.; BURGESS, D. S.; MANDRURU, M.; BOSSO, J. A. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard and E-test. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 8, p. 1914-1918, 1996.

VENNEWALD, I.; KLEMM, E. Otomycosis: Diagnosis and treatment. **Clinics in Dermatology**, v. 28, n. 2, p. 202-211, 2010.

WORBOYS, M. Joseph Lister and the performance of antiseptic surgery. **Notes and Records of The Royal Society of London Journal**, v. 67, n. 3, p. 199–209, 2013.

YANG, Z. et al. Comparative anti-infectious bronchitis virus (IBV) activity of (-)-pinene: Effect on nucleocapsid (N) protein. **Molecules**, v. 16, n. 2, p. 1044–1054, 2011.

ZIDA, A.; BAMBA, S.; YACOUBA, A.; OUEDRAOGO-TRAAORE, R.; GUIGUEMDÉ, T. R. Anti-*Candida albicans* natural products, sources of new antifungal drugs: A review. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 27, n. 1, p. 1-19, 2017.

ANEXOS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* do α -pineno contra *Candida* spp. isoladas de pacientes com otomicose.

Pesquisador: JEFFERSON RODRIGUES NOBREGA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 80255417.5.0000.5188

Instituição Proponente: Centro De Ciências da Saúde

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.410.809

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de pesquisa egresso do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde, da UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA, do aluno JEFFERSON RODRIGUES NOBREGA, sob orientação da professora Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Investigar a atividade antifúngica *in vitro* do -pineno contra espécies de *Candida*, bem como avaliar os seus parâmetros farmacológicos *in silico*.

Objetivos Secundários:

-Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do -pineno, antifúngicos convencionais e ácido bórico contra cepas de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* isoladas de otomicoses;

-Determinar a Concentração Fungicida Mínima (CFM) do -pineno e demais produtos contra

as cepas em análise;

-Avaliar a interferência do monoterpene sobre a micromorfologia das leveduras; -Investigar o efeito da associação do fitoconstituente com antifúngicos convencionais ou ácido bórico contra espécies de *Candida*;

-Determinar os parâmetros farmacológicos do -pineno por ensaios *in silico*.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

As etapas do estudo serão realizadas sem adição de riscos ou danos aos participantes da pesquisa ou prejuízos ao bem-estar dos mesmos. O pesquisador, orientador e demais colaboradores envolvidos no Projeto em questão se comprometem, individual e coletivamente, a utilizar os dados provenientes deste, apenas para os fins descritos e a cumprir todas as Diretrizes e Normas descritas na Resolução CNS N°466/12, e suas complementares.

Benefícios:

Busca por novas alternativas terapêuticas provenientes de plantas medicinais para o tratamento de infecções fúngicas do ouvido externo (otomicose). As plantas medicinais e seus metabólitos surgem como uma fonte rica de compostos, com grande variedade molecular e propriedades biológicas comprovadas. Devido aos problemas observados com os fármacos antifúngicos convencionais/licenciados se faz necessário a busca por novas substâncias com propriedades antifúngicas significativas para melhora da efetividade de tratamentos de infecções causadas por fungos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O presente projeto apresenta coerência científica, mostrando relevância para a academia, haja vista a ampliação do conhecimento, onde se busca, principalmente, Investigar a atividade antifúngica *in vitro* do - pineno contra espécies de *Candida*, bem como avaliar os seus parâmetros farmacológicos *in silico*.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os Termos de Apresentação Obrigatória foram anexados tempestivamente.

Recomendações:

RECOMENDAMOS QUE AO TÉRMINO DO ESTUDO, O PESQUISADOR

RESPONSÁVEL ENCAMINHE AO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA, RELATÓRIO FINAL, PESQUISA NA ÍNTEGRA E DOCUMENTO DEVOLUTIVO, PDF, VIA PLATAFORMA BRASIL, ATRAVÉS DE NOTIFICAÇÃO, PARA OBTENÇÃO DA CERTIDÃO DEFINITIVA.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Tendo em vista o cumprimento das formalidades éticas e legais, SOMOS DE PARECER FAVORÁVEL A EXECUÇÃO DO PRESENTE PROJETO DA FORMA COMO SE APRESENTA, SALVO MELHOR JUÍZO.

Considerações Finais a critério do CEP:

Certifico que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba – CEP/CCS aprovou a execução do referido projeto de pesquisa.

Outrossim, informo que a autorização para posterior publicação fica condicionada à submissão do Relatório Final na Plataforma Brasil, via Notificação, para fins de apreciação e aprovação por este egrégio Comitê.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_1023646.pdf	20/11/2017 22:04:03		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_Pesquisa.pdf	20/11/2017 22:03:09	JEFFERSON RODRIGUES NOBREGA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Certidao_de_aprovacao_projeto.pdf	20/11/2017 21:53:17	JEFFERSON RODRIGUES NOBREGA	Aceito
Outros	Solicitacao_de_utilizacao_dos_micro_or ganismos.pdf	19/11/2017 15:37:05	JEFFERSON RODRIGUES NOBREGA	Aceito
Outros	Carta_de_anuencia.pdf	19/11/2017 15:35:30	JEFFERSON RODRIGUES NOBREGA	Aceito
Outros	Declaracao_de_experimentos_nao_inici ados.pdf	19/11/2017 14:55:46	JEFFERSON RODRIGUES NOBREGA	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	19/11/2017 14:46:44	JEFFERSON RODRIGUES NOBREGA	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	19/11/2017 13:21:45	JEFFERSON RODRIGUES NOBREGA	Aceito

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Solicitacao_de_isencao_do_TCLE.pdf	19/11/2017 13:21:26	JEFFERSON RODRIGUES NOBREGA	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	19/11/2017 13:20:17	JEFFERSON RODRIGUES NOBREGA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JOAO PESSOA, 01 de Dezembro de 2017

Assinado por:
**Eliane Marques
Duarte de Sousa
(Coordenador)**