

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

**DANIELLE DA NÓBREGA ALVES**

**Atividade antifúngica e investigação da segurança do cinamaldeído na forma isolada e de pomada orabase: um estudo *in vitro*, *in vivo* e clínico fase I**

**João Pessoa-PB**

**2021**

**DANIELLE DA NÓBREGA ALVES**

**Atividade antifúngica e investigação da segurança do cinamaldeído na forma isolada e de pomada orabase: um estudo *in vitro*, *in vivo* e clínico fase I**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento às exigências para obtenção do título de doutora em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Área de concentração: FARMACOLOGIA.

**ORIENTADOR:**

**Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro**

**João Pessoa-PB**

**2021**

**DANIELLE DA NÓBREGA ALVES**

**Atividade antifúngica e investigação da segurança do cinamaldeído na forma isolada e de pomada orabase: um estudo *in vitro*, *in vivo* e clínico fase I**

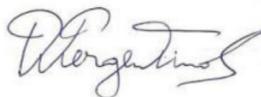
**APROVADA EM 21/05/2021**

**COMISSÃO EXAMINADORA**



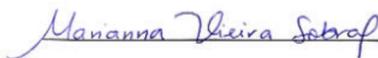
---

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Ricardo Dias de Castro  
Orientador



---

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Damião Pergentino de Sousa  
Membro interno titular



---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marianna Vieira Sobral  
Membro interno titular



---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jozinete Vieira Pereira  
Membro externo titular



---

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Paulo Rogerio Ferreti Bonan  
Membro externo titular

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

A474a Alves, Danielle da Nobrega.

Atividade antifúngica e investigação da segurança do cinamaldeído na forma isolada e de pomada orabase : um estudo in vitro, in vivo e clínico fase I / Danielle da Nobrega Alves. - João Pessoa, 2021.

94 f. : il.

Orientação: Ricardo Dias de Castro.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Candidíase oral. 2. Produtos antimicrobianos. 3. Antifúngicos. 4. Produtos biológicos. 5. Toxicologia.  
I. Castro, Ricardo Dias de. II. Título.

UFPB/BC

CDU 616.934(043)

Ao meu esposo Paulo André por  
todo o amor, companheirismo e  
paciência compartilhados comigo  
em todos os momentos que vivemos  
e aos meus filhos Isadora e Eduardo  
por darem sentido a tudo.  
Dedico

## AGRADECIMENTOS

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43

Primeiramente a Deus, por ter guiado meus passos, ter me conduzido com sua graça e sabedoria nesse caminhar, me dando paciência e perseverança para realizar todos os meus sonhos. Obrigada por estar sempre ao meu lado nos momentos de fraqueza e nos de conquista. A sua presença me dá forças para continuar lutando.

Aos meus familiares, em especial aos meus pais, Humberto e Joana, pelo amor, incentivo, pela educação dada, por todo esforço despojado na minha criação e por todos os ensinamentos de dignidade, honestidade e respeito.

Ao meu esposo Paulo André e meus filhos Isadora e Eduardo, pelo apoio incondicional em todos os momentos e planos da minha vida. Vocês são e sempre serão fundamentais para todas as minhas conquistas. Obrigada pela bondade de renunciar seus sonhos para investir nos meus. Essa conquista é de vocês.

A meu orientador, prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Ricardo Dias de Castro, por sempre confiar e não desistir de mim, pelos ensinamentos adquiridos, pela amizade construída, por me proporcionar avançar nos conhecimentos, me deixando “voar”, mas ao mesmo tempo por estar lá em todas as vezes que caí e precisei de você, pelo convívio agradável, por me ouvir e ser tão presente. Você me proporcionou crescer e amadurecer como docente desde o mestrado, confiando colaborar com os alunos de nosso grupo. Você é exemplo de honestidade, dedicação e humildade. Com você aprendi que pesquisa se faz com muita paciência e amor. Toda essa admiração e gratidão, se estende a sua esposa prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Giselly Abílio de Castro. Obrigada por tudo que vocês fizeram por mim.

Ao prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Adriano Francisco Alves por toda colaboração nas análises histopatológicas e por sempre estar disposto a me ajudar com muita paciência e dedicação para que eu aprendesse o passo-a-passo de tudo que estivesse fazendo. Você foi fundamental a boa parte de minha tese. Você é um ser humano que admiro muito. Obrigada por sua amizade.

Ao prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Felipe Queiroga Sarmiento Guerra pela colaboração na análise *in vitro* de micromorfologia e por todos os ensinamentos desde o meu mestrado na microbiologia. Serei eternamente grata por tanta ajuda, por tantas dúvidas sanadas, por tanta disponibilidade.

Ao prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Pedro Luiz Rosalen e a sua aluna Dr<sup>a</sup>. Josy Goldoni Lazarini pelas colaborações com a toxicologia na *Galleria mellonella*.

Ao prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Davi Felipe Farias e seus alunos Me. Rafael Xavier Martins e Luana Souza Amorim pelos ensinamentos e paciência com a toxicologia em embriões de peixe-zebra.

À prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tatianne Mota Batista, pela colaboração nos ensaios de genotoxicidade.

1 Aos profs. Drs. Damião Pergentino de Sousa, Edeltrudes de Oliveira Lima, Edja Maria Melo  
2 de Brito Costa, Jozinete Vieira Pereira, Marianna Vieira Sobral, Paulo Rogério Ferreti Bonan,  
3 pela gentileza em participar da avaliação deste trabalho.

4  
5 Aos professores da banca de qualificação, profs. Drs. Adriano Francisco Alves, Felipe Queiroga  
6 Sarmiento Guerra e Marianna Vieira Sobral por aceitarem o convite e pelas contribuições que  
7 enriqueceram meu trabalho.

8  
9 Aos professores do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos  
10 pelos seus ensinamentos e até mesmo pelas críticas que me ajudaram a crescer.

11  
12 Ao prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Reinaldo Nóbrega pelo acolhimento, amizade e parceria no laboratório de  
13 psicofarmacologia e a todos que compõem esse grupo. Parceria e amizade para toda vida.

14  
15 Ao coordenador do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos,  
16 prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Marcelo Sobral Da Silva, pela atenção, disponibilidade e dedicação, sempre pautado  
17 na ética, na boa convivência e no acolhimento aos alunos. Mesmo em meio à pandemia, com  
18 muitas situações adversas, o senhor sempre foi solícito à resolução de minhas pautas. Serei  
19 eternamente grata.

20  
21 Ao prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Lúcio Castellano por toda paciência, gentileza e disponibilidade no uso dos  
22 equipamentos da escola técnica de saúde. Obrigada pela convivência extremamente agradável.

23  
24 À técnica do Laboratório de Farmacologia experimental e cultivo celular, Dr<sup>a</sup>. Patrícia, por ter  
25 me ensinado muito do que eu sei sobre planejamento experimental, pela colaboração nas  
26 análises de hemólise, por sempre me escutar esclarecendo todas as minhas dúvidas. Você  
27 chegou no momento crucial no laboratório, véspera de seleção de doutorado me dando um  
28 conselho que foi decisivo para minha aprovação. Obrigada pela amizade e as incansáveis  
29 conversas que deixarão saudades.

30  
31 À técnica do Laboratório de Imunopatologia experimental Me. Mayara e ao aluno de iniciação  
32 científica, Rubens, pelo apoio dado no preparo das lâminas e pela amizade.

33  
34 À Karoline Vieira Melo e Maria Rejane Cruz de Araújo por todo apoio logístico e emocional,  
35 além da dedicação na coleta dos dados do ensaio clínico. Sem vocês duas não teria conseguido  
36 desenvolver uma pesquisa clínica, em meio à pandemia, com toda insegurança de contaminação  
37 e falta de insumos. Parceria para a vida.

38  
39 Às alunas de doutorado Jéssica Cabral de Andrade e Elba dos Santos Ferreira por todo apoio  
40 nos experimentos de segurança em modelo animal.

41  
42 Aos colegas da pós-graduação pela boa convivência e por tornarem os momentos difíceis em  
43 algo agradável. Em especial a Jéssica Cabral e Rafael Carlos por se fazerem presente quando  
44 mais precisei, por sempre estarem disponíveis em tirar minhas dúvidas. Foi desafiador para  
45 mim como odontóloga enfrentar um doutorado em farmacologia. O apoio de vocês foi decisivo.  
46 Contem comigo sempre.

47

1 Aos funcionários da UFPB que me ajudaram nos momentos de dificuldades, em especial à  
2 Caroline Manguiera por toda atenção, disponibilidade e solicitude em resolver todos os meus  
3 problemas. Para mim você é um exemplo de servidora pública que trabalha com amor e é feliz  
4 com o que faz. Muito obrigada.

5  
6 Aos extensionistas da “Educação e promoção do uso racional de medicamentos”. Em especial  
7 a Ana Karoline, David, Gisely, Letícia, Marcela, Marta, Raíres, Rejane e Ricardo. Obrigada por  
8 tantos momentos singulares, pelo compartilhamento de conhecimento e por toda experiência  
9 vivida. Amei trabalhar com vocês para levar um pouco de do sabíamos para a comunidade.  
10 Esse é o papel da ciência.

11  
12 Aos alunos da graduação David Henrique, Martha Henriques, Regina Araújo, Gleyce  
13 Rodrigues, Palloma Costa; aos alunos de mestrado Ana Paula Lopes, Raíres Machado, Natália  
14 Pazos, Ana Karoline Vieira, Joyce Barboza; e aos alunos de doutorado Hermes, Jéssica Cabral,  
15 Pablo Rayff e Isabele Jardelino os quais tive o privilégio, a honra e a oportunidade em colaborar  
16 com seus respectivos experimentos. De tudo que vivenciei na minha pós, acompanhar esses  
17 alunos foi o mais gratificante, o que mais me enriqueceu. A forma como saio do doutorado, tem  
18 muito deles por trás. Obrigada novamente ao professores Ricardo, Damião, Felipe, Gisely e  
19 Reinaldo por me proporcionar essa experiência extraordinária.

20  
21 Aos pacientes que se dispuseram a aceitar participar do ensaio clínico em meio à uma pandemia,  
22 com tantas inseguranças e incertezas. Levo cada um em meu coração, cada gentileza, palavra  
23 de carinho, atenção, entrega e gratidão. Sem vocês minha tese não teria sentido.

24  
25 Aos meus colegas de trabalho do setor de triagem do curso de Odontologia da UFPB. Em  
26 especial ao meu amigo Alexandre Diniz que se disponibilizou a me substituir para que eu  
27 tivesse a oportunidade de exclusivamente estudar durante os 6 meses de meu afastamento. E a  
28 meu querido chefe, prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup> Paulo Bonan, pela compreensão nas minhas ausências e correrias.  
29 Uma honra trabalhar ao lado desse professor tão capacitado, dedicado, solícito e acima de tudo,  
30 humano. Você é exemplo a ser seguido na clínica. Muito obrigada por tudo e, nesse momento,  
31 espero retribuir para o setor tudo que me foi oportunizado a aprender e melhorar cada vez mais  
32 nosso setor de trabalho, fazendo um curso de odontologia cada vez com mais qualidade.

33  
34 À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES através dos  
35 recursos PROEX e à UFPB pelo apoio financeiro e as condições para a realização do trabalho.

36  
37 A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

38  
39  
40  
41

1 ALVES, D.N. **Atividade antifúngica e investigação da segurança do cinamaldeído na**  
2 **forma isolada e de pomada orabase: um estudo *in vitro*, *in vivo* e clínico fase I.** 2021. 118f.  
3 Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – UFPB/CCS, João Pessoa.

## 5 RESUMO

6 **Objetivo:** Avaliar a atividade antifúngica e investigar a segurança do cinamaldeído na forma  
7 isolada e de pomada orabase através de um estudo *in vitro*, *in vivo* e clínico fase I. **Métodos e**  
8 **resultados:** Foi avaliada a interferência do cinamaldeído sobre a micromorfologia fúngica e  
9 sua capacidade em reduzir o biofilme em análise *in vitro*. Para o estudo de citotoxicidade foi  
10 realizado o teste de hemólise em eritrócitos humanos. As microculturas tratadas com  
11 cinamaldeído mostraram desenvolvimento celular prejudicado, com raras expressões de  
12 pseudo-hifas e ausência de clamidoconídios. Ele reduziu o biofilme em 64,52% a 33,75% (  
13  $p < 0,0001$ ) em baixas concentrações (378,3-151,3  $\mu\text{M}$ ) bem como não se mostrou citotóxico  
14 frente a eritrócitos. A toxicidade aguda foi avaliada em estudos com larvas da *Galleria*  
15 *mellonella* e embriões de Danio rerio (zebrafish) e genotoxicidade em modelo com  
16 camundongos. A formulação farmacêutica (pomada orabase) contendo cinamaldeído foi  
17 avaliada para verificação da atividade antifúngica *in vitro* e toxicidade em mucosa oral  
18 ceratinizada de ratos. O cinamaldeído não foi tóxico até a maior dose testada (20 mg/Kg) nas  
19 larvas da *Galleria mellonella*, bem como não apresentou genotoxicidade até a dose de 4 mg/Kg  
20 em modelo com camundongos. Contudo, se mostrou tóxico nos embriões de zebrafish até a  
21 concentração de 0,035 $\mu\text{g/mL}$ ; LC50 0,311 $\mu\text{g/mL}$ ; EC50 0,097  $\mu\text{g/mL}$  (Egg hatching delay);  
22 0,105  $\mu\text{g/mL}$  (Pericardial edema). No teste de susceptibilidade antifúngica da orabase, o  
23 cinamaldeído exibiu atividade em concentrações superiores a 200 $\mu\text{g/mL}$ . Quanto à segurança  
24 em modelo animal com ratos, a pomada orabase se mostrou segura para uso em mucosa  
25 ceratinizada até a máxima concentração testada (700  $\mu\text{g/mL}$ ). O ensaio clínico foi realizado em  
26 35 indivíduos com mucosa oral saudável divididos em três grupos: pomada de 200 $\mu\text{g/mL}$ ,  
27  $n=12$ ; 300 $\mu\text{g/mL}$ ,  $n=11$  e 400 $\mu\text{g/mL}$ ,  $n=12$ . A segurança do produto foi avaliada por três  
28 parâmetros: (a) evolução clínica registrada por examinadores calibrados; (b) evolução dos  
29 processos inflamatórios registrados pelo exame de citologia esfoliativa e analisada por  
30 patologistas calibrados; (c) redução das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) para  
31 *Candida* spp. Os três parâmetros foram analisados antes e 15 dias após o tratamento. O exame  
32 clínico da mucosa mostrou que as três concentrações das pomadas não desencadearam nenhum  
33 processo inflamatório e evento indesejável. A análise micológica, mostrou uma redução de pelo  
34 menos 99% na quantidade de UFCs dos voluntários. Na análise por citologia esfoliativa, as  
35 células se apresentaram saudáveis. Os participantes relataram um sabor agradável e 17%  
36 relataram um leve ardor ao aplicar o produto. **Conclusões:** O cinamaldeído apresentou  
37 atividade antifúngica demonstrando capacidade em reduzir biofilme e alterar a  
38 micromorfologia fúngica. Além disso, não foi citotóxico para eritrócitos humanos, nem tóxico  
39 em modelo animal de vertebrados (exceção o peixe-zebra) e invertebrados, bem como não  
40 apresentou atividade genotóxica. Além disso, quando utilizado na forma de pomada em  
41 orabase, com reconhecida atividade antifúngica contra *Candida albicans*, não mostrou  
42 evidências clínicas e histológicas de processo inflamatório em mucosa de animais. Em modelo  
43 com seres humanos, a pomada em orabase contendo cinamaldeído foi segura e tolerável para  
44 ser usado no ensaio clínico fase II com a finalidade de comprovar sua eficácia no tratamento da  
45 estomatite protética.

46 **Palavras-chave:** Candidíase oral; produtos antimicrobianos; antifúngicos; produtos biológicos,  
47 toxicologia.

48

1 ALVES, D.N. **Antifungal activity and investigation of the safety of cinnamaldehyde in**  
2 **isolate and orabase ointment: an *in vitro*, *in vivo* and clinical phase I study.** 2021. 118f.  
3 Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – UFPB/CCS, João Pessoa.

## 4 5 ABSTRACT

6 **Objective:** To evaluate the antifungal activity and investigate the safety of cinnamaldehyde in  
7 isolated form in orabase ointment through an *in vitro*, and *in vivo* and clinical phase I study.

8 **Methods and results:** The interference of cinnamaldehyde on fungal micromorphology and its  
9 ability to reduce biofilm was evaluated *in vitro* analysis. For the cytotoxicity study, the  
10 hemolysis test was performed on human erythrocytes. Micro-cultures treated with  
11 cinnamaldehyde demonstrated impaired cell development, with rare pseudohyphae expressions  
12 and the absence of *chlamydoconidia*. Cinnamaldehyde reduced biofilm by 64.52% to 33.75%  
13 ( $p < 0.0001$ ) at low concentrations (378.3-151.3  $\mu\text{M}$ ) and was not cytotoxic to erythrocytes.  
14 Acute toxicity has already been assessed in studies with *Galleria mellonella* larvae and *Danio*  
15 *rerio* embryos (zebrafish), and genotoxicity has been assessed in a mouse model. The  
16 pharmaceutical formulation (orabase ointment) containing cinnamaldehyde was evaluated for  
17 verification of antifungal activity *in vitro*, and for toxicity in keratinized oral rat mucosa.  
18 Cinnamaldehyde was not toxic at the highest dose tested (20 mg/kg) in *Galleria mellonella*  
19 larvae and did not present genotoxicity up to a dose of 4 mg/kg in the mouse model. However,  
20 it was found to be toxic in zebrafish embryos up to a concentration of 0.035  $\mu\text{g/mL}$ ;  $\text{LC}_{50}$  0.311  
21  $\mu\text{g/mL}$ ;  $\text{EC}_{50}$  0.097  $\mu\text{g/mL}$  (Egg hatching delay); 0.105  $\mu\text{g/mL}$  (Pericardial edema). In the  
22 orabase antifungal susceptibility test, cinnamaldehyde exhibited activity in concentrations  
23 greater than 200 $\mu\text{g/mL}$ . As for safety in an animal model with rats, the orabase ointment proved  
24 to be safe for use on keratinized mucosa up to the maximum concentration tested (700  $\mu\text{g/mL}$ ).  
25 The clinical trial was carried out in 35 individuals with healthy oral mucosa divided into three  
26 groups: 200 $\mu\text{g/mL}$  ointment,  $n = 12$ ; 300 $\mu\text{g/mL}$ ,  $n = 11$  and 400 $\mu\text{g/mL}$ ,  $n = 12$ . Product safety  
27 was assessed by three parameters: (a) clinical evolution recorded by trained examiners; (b)  
28 evolution of the inflammatory processes registered by an exfoliative cytology exam and  
29 analysis by trained pathologists; (c) *Candida* spp. Colony Forming Units (CFUs) verification.  
30 The three parameters were analyzed before treatment and at 15 days afterwards. The clinical  
31 mucosa examination showed that the three concentrations of the ointments triggered no  
32 inflammatory processes or undesirable events. Mycological analysis revealed a reduction of at  
33 least 99% in the number of CFUs for the volunteers. In the analysis by exfoliative cytology, the  
34 cells were healthy. The participants reported a pleasant taste though 17% reported a slight  
35 burning sensation when applying the product. **Conclusions:** Cinnamaldehyde presented  
36 antifungal activity, demonstrating its ability to reduce biofilm and alter fungal  
37 micromorphology. In addition, it was not cytotoxic to human erythrocytes, nor toxic in animal  
38 models with vertebrates (exception the zebra fish) and invertebrates, nor did it present genotoxic  
39 activity. In addition, when used in the form of an ointment in orabase, with recognized  
40 antifungal activity against *Candida albicans*, it did not present clinical or histological evidence  
41 of inflammation in animal mucosa. In the human model, the ointment in orabase containing  
42 cinnamaldehyde was found to be safe and tolerable for used in phase II clinical trials to prove  
43 its effectiveness in prosthetic stomatitis treatment.

44 **Keywords:** Oral candidiasis; antimicrobial products; antifungal; biological products,  
45 toxicology.

1

## ABREVIATURAS E SIGLAS

- 2 ATCC - *American Type Culture Collection*  
3 *C. albicans* – *Candida albicans*  
4 *C. parapsilosis* – *Candida parapsilosis*  
5 *C. tropicalis* – *Candida tropicalis*  
6 *C. glabrata* – *Candida glabrata*  
7 *C. krusei* – *Candida krusei*  
8 *C. guilliermondii* – *Candida guilliermondii*  
9 *C. lusitaniae* – *Candida lusitaniae*  
10 *C. auris* – *Candida auris*  
11 Ssa1p – forma citosólica da subfamília das proteínas de choque térmico HSP70 (Heat Shock  
12 Protein).  
13 Als3 - proteínas de sequência semelhante à aglutinina  
14 EGFR - receptor do fator de crescimento epidérmico  
15 EphA2 - receptor de reconhecimento de padrão de células epiteliais para  $\beta$ -glucanos fúngicos  
16 Hwp1p - Hyphal wall protein 1 (proteína da parede da hifa)  
17 Her2 - receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano  
18 Saps - proteinases aspárticas secretoras  
19 Msb2p - proteína da superfície celular  
20 MAPK - Proteína quinase ativada por mitogênio  
21 PI3K - fosfoinositol 3-quinase  
22 AKT – proteína quinase B (ou PKB)  
23 NF- $\kappa$ B (*factor nuclear kappa B*) é um complexo proteico que desempenha funções como factor  
24 de transcrição  
25 JNK - c-Jun N-terminal quinase  
26 ERK1 -quinases extracelulares reguladas por sinal  
27 IL- interleucina  
28 IL-36R – receptor de interleucina 36  
29 IL-1R – receptor de interleucina 1  
30 CIM - Concentração Inibitória Mínima  
31 ERG - genes envolvidos na síntese de ergosterol  
32 FKS - Genes da síntese do glucano  
33 iKIX1 – inibidor do domínio KIX  
34 KIX – complexo mediador das bombas de efluxo  
35 CMLD – inibidor de Hsp90  
36 Yck2 - quinase da caseína  
37 GW - 2,3-aril-pirazolopiridina  
38 Cyp51 - citocromo 51  
39 TLR2 - receptor toll-like 2  
40 CR3 - receptor de complemento  
41 *Cinnamomum zeylanicum* - *C. zeylanicum*  
42 PDB - protein data bank  
43 *Galleria mellonella* - *G. mellonella*  
44 Hpf - horas após a fertilização  
45 CSD - Caldo Sabouraud Dextrose  
46 ASD - Ágar Sabouraud Dextrose  
47 TEP - Toxicidade Aguda de Embriões de Peixe  
48 LC<sub>50</sub> - concentração letal mediana  
49 EC<sub>50</sub> - concentração efetiva mediana  
50 i.p. – intraperitoneal

- 1 INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial
- 2 UFC – Unidade Formadora de Colônia
- 3  $k$  – coeficiente *kappa*
- 4 DP – Desvio-padrão
- 5 LOAEL - *Lowest-observed-adverse-effect level*
- 6 NOAEL - *No observed adverse effect level*
- 7 PE - Edema pericárdico
- 8 DD - Atraso no desenvolvimento
- 9 NDTB - não desprendimento da base da cauda
- 10 YSE - edema do saco vitelino
- 11 MF - Malformação
- 12 CE - Embrião coagulado
- 13 Ep - Epiderme
- 14 Dm – Derme
- 15 VEGF - fator de crescimento endotelial vascular
- 16 TRPA1 - potencial receptor transitório da anquirina
- 17

## LISTA DE FIGURAS

1

2	<b>Figura 1.</b> Aspectos clínicos da estomatite protética. A – Estomatite tipo I; B – Estomatite tipo II; C –	
3	Estomatite tipo III. * Fotos autorizadas pelo paciente e de responsabilidade do grupo de pesquisa	
4	coordenado pelo Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro. ....	27
5	<b>Figura 2.</b> Interações de <i>Candida albicans</i> com células epiteliais do hospedeiro. (1) Interações iniciais;	
6	(2) Transição para a morfologia das hifas; (3) A internalização das hifas de <i>C. albicans</i> ; (4) Secreção	
7	dos fatores de virulência. Adaptado de Nikou et al., 20.....	28
8	<b>Figura 3.</b> Imunidade inata da mucosa a <i>Candida albicans</i> . Adaptado de Pellon, Nasab, Moyes, 2020.	
9	.....	30
10	<b>Figura 4.</b> Remodelação epigenética de células imunes, levando ao desenvolvimento de respostas agudas	
11	ou de longo prazo. Adaptado de Pellon, Nasab, Moyes, 2020.....	31
12	<b>Figura 5.</b> Mecanismo de ação dos polienos. A. membrana fúngica. B. Membrana fúngica após ação da	
13	anfotericina B com formação da esponja de esterol (anfotericina B + ergosterol). Adaptado de Lee et	
14	al., 2020.....	33
15	<b>Figura 6.</b> Mecanismo de ação dos azóis. A. membrana fúngica. B. Membrana fúngica após ação da azol.	
16	O lanosterol se transformou em esterol tóxico provocando estresse na membrana Adaptado de Lee et	
17	al., 2020.....	33
18	<b>Figura 7.</b> Mecanismo de ação das equinocandinas. Elas impedem a síntese de (1,3) - $\beta$ -glucano	
19	resultando em perda de integridade e estresse severo da parede celular. A- Célula fúngica normal. B-	
20	Estresse celular decorrente do bloqueio da enzima (1,3) - $\beta$ -glucano sintase, a qual é responsável pela	
21	síntese da parede celular. Adaptado de Lee et al., 2020.....	34
22	<b>Figura 8.</b> Estratégias terapêuticas de combate à resistência microbiana: Terapia combinada - aumento	
23	da biodisponibilidade da fármaco. Adaptado de Lee, Puumala, Robbins & Cowen, 2020. A- Célula	
24	fúngica resistente à fármaco “A”. A bomba de efluxo (azul), juntamente com seu mediador (roxo),	
25	transportam o fármaco do citoplasma para o meio extracelular, fazendo com que ele não consiga realizar	
26	sua função de desestabilizá-la. B- O inibidor iKIX1 sinergiza com os azóis e ressensibiliza isolados	
27	resistentes ao fluconazol. Ele atua bloqueando o domínio KIX dentro do complexo mediador (roxo)	
28	impedindo a regulação positiva de genes que codificam bombas de efluxo e com isso, fazendo com que	
29	a mesmas não atuem jogando a fármaco para fora da célula. ....	36
30	<b>Figura 9.</b> Estratégias terapêuticas de combate à resistência microbiana: Terapia combinada-	
31	direcionamento de resposta ao estresse celular. A- Resposta da célula fúngica à ação de medicamentos	
32	resistentes. As bombas de efluxo através do gene <i>Erg11</i> conseguiu expulsar o fármaco do interior da	
33	célula com a colaboração da resposta ao estresse através do <i>Hsp90</i> . B- A fármaco “A” não conseguiu	
34	mais se expulsa do interior da célula pois sua combinação com a fármaco “B” bloqueou a resposta ao	
35	estresse fazendo com que as bombas de efluxo não atuassem com a mesma eficácia. Com isso, a fármaco	
36	“A” conseguiu permanecer no interior da célula fúngica para promover sua função que é de debelar a	
37	célula fúngica. Adaptado de Lee, Puumala, Robbins & Cowen, 2020.....	37
38	<b>Figura 10.</b> Estratégias terapêuticas de combate à resistência microbiana: Terapia combinada-inibição	
39	da quinase da caseína. A- Demonstração de vias paralelas de duas fármacos com um único objetivo. B-	
40	Exemplo dessas vias paralelas temos as equinocandinas (fármaco “A”) que atuam na enzima (1,3) - $\beta$ -	
41	glucano-sintase com a finalidade de desestabilizar a síntese da parede celular e a fármaco GM (fármaco	
42	“B”), a qual também tem a mesma função, só que sua atuação é em ponto diverso de uma via paralela	
43	(quinase da caseína <i>Yck2</i> ). Adaptado de Lee, Puumala, Robbins & Cowen, 2020. ....	38
44	<b>Figura 11.</b> Estrutura química do cinamaldeído. ....	40
45	<b>Figura 12.</b> Etapas gerais do estudo. ....	45
46	<b>Figura 13.</b> Desenho esquemático da câmara úmida utilizada no teste de micromorfologia. ....	47

1	<b>Figura 14.</b> Diagrama de fluxo CONSORT para estudo clínico de Fase I em pacientes sem estomatite protética. Os sujeitos do estudo receberam uma pomada em orabase divididos em três grupos (200µg/mL; 300µg/mL; 400µg/mL). A primeira coorte recebeu a pomada de 200 µg/mL. Essa concentração foi aumentada em coortes subsequentes de 300 µg/mL e 400 µg/mL, usando um desenho 3+3 para avançar intragrupo entre os participantes. A aplicação foi de forma tópica, três vezes ao dia, por 15 dias.....	54
7	<b>Figura 15.</b> Fluxograma do protocolo de intervenção (Adaptado de Consort Statement). .....	57
8	<b>Figura 16.</b> Imagens representativas (de um grupo experimental) dos efeitos do cinamaldeído e da nistatina na micromorfologia de <i>Candida albicans</i> ATCC 90028 e <i>Candida krusei</i> ATCC 6258. (1 e 4) controle de levedura; (2 e 5) tratamento com cinamaldeído a 37,83 µM; (3 e 6) tratamento com nistatina a 81,43 µM. a: pseudo-hifas. b: blastoconídios. C. clamidoconídeos. Bar: 50µm (400x). .....	61
12	<b>Figura 17.</b> Efeito inibitório de cinamaldeído e nistatina contra biofilme de múltiplas espécies de <i>Candida</i> . Os resultados apresentados como média ± DP de três experimentos independentes realizados em triplicata (ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey, **** P <0,0001 em comparação com o controle). .....	62
16	<b>Figura 18.</b> Efeitos antifúngicos da pomada-teste de cinamaldeído frente à cepa de <i>Candida albicans</i> . O gráfico representa a média ± DP de três experimentos independentes realizados em triplicado. ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey foi realizada para comparação entre os grupos, **** P <0,0001, ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05 em relação ao controle positivo. ....	63
20	<b>Figura 19.</b> Imagens dos halos de inibição das pomadas. *a (pomada de 200µg/mL); b (pomada de 300µg/mL); c (pomada de 400µg/mL); d (pomada de 500µg/mL); e (pomada de 600µg/mL); f (pomada de 700µg/mL); g (pomada de 800µg/mL); C+ (controle positivo – miconazol). .....	64
23	<b>Figura 20.</b> Efeitos citotóxicos do cinamaldeído contra os eritrócitos humanos. Eritrócitos humanos com tipo sanguíneo A +, B +, AB + e O + foram incubados em diferentes concentrações cinamaldeído durante 1h a 37°C e a atividade hemolítica foi determinada por ensaio colorimétrico. O gráfico representa a média ± DP de três experimentos independentes realizados em duplicata. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey foi realizado para comparação entre os grupos, sendo ****p<0,0001. ....	65
28	<b>Figura 21.</b> Toxicidade sistêmica do cinamaldeído no modelo de larvas de <i>Galleria mellonella</i> . As larvas receberam tratamento com controle (C; solução NaCl 0,9%), veículo (DMSO) na dose de 40 mg/Kg e cinamaldeído nas doses de 0,15; 0,31; 0,62; 1,25; 2,5; 5; 10 e 20 mg/Kg por 72h. Todos os grupos foram comparados com o grupo controle (C). P >0,05, teste de log-rank. ....	66
32	<b>Figura 22.</b> Sobrevivência do peixe-zebra após exposição ao cinamaldeído. Efeito do cinamaldeído na taxa de sobrevivência de embriões e larvas de peixe-zebra após 96h de exposição. A presença de qualquer efeito letal foi contada como mortalidade. N=20 embriões/ grupo. hpf: Horas pós fertilização. p= 0.024 para a concentração 0.28µg/mL e p< 0.0001 para a concentração 0.56 µg/mL quando comparado com o controle. ....	67
37	<b>Figura 23.</b> Visão geral dos efeitos cumulativos do cinamaldeído em embriões e larvas de peixe-zebra após 96h de exposição. Nenhum efeito: características morfológicas semelhantes aos organismos não tratados; Efeitos não-letais: presença de alterações subletais; Mortalidade: presença de desfechos de mortalidade. N = 20 embriões/grupo. hpf: Hora pós-fertilização. ....	67
41	<b>Figura 24.</b> Efeitos letais e não letais observados em embriões e larvas de peixe-zebra após exposição a concentrações crescentes de cinamaldeído durante 96 h. (a), (b), (c) e (d) são organismos controle com desenvolvimento normal após 24, 48, 72 e 96 hpf, respectivamente, expostos apenas ao meio E3; (e) e (f) embriões com 96 hpf, expostos a 0,07 e 0,035 µg / mL, respectivamente, ambos com edema pericárdico (PE); (g) embrião com 24 hpf exposto a 0,14 µg/mL apresentando atraso no desenvolvimento (DD); (h) e (i) embriões com 48 e 96 hpf, respectivamente, expostos a 0,14 µg / mL, ambos com edema pericárdico (PE); (j) embrião após 24 hpf, exposto a 0,28 µg/mL, apresentando retardo de desenvolvimento (DD) e não desprendimento da base da cauda (NDTB); (k) e (l) embriões com 48 e 96 hpf expostos a 28 µg/mL apresentando edema pericárdico (EP) e edema do saco vitelino (YSE), respectivamente e (l) edema do saco vitelino (YSE); (m) e (n) são embriões com 24 e 48 hpf,	

1	respectivamente, expostos a 56 µg/mL de cinamaldeído, apresentando malformação (MF) e atraso de	
2	desenvolvimento (DD); (o) embrião coagulado (CE) após 72 h de exposição a 56 µg/mL. ....	69
3	<b>Figura 25.</b> Histologia do palato duro dos ratos após uso das pomadas em orabase contendo cinamaldeído	
4	nas diferentes concentrações (H/E, x10). A- Grupo pomada concentração 25 µg/mL; B- grupo pomada	
5	concentração 50 µg/mL; C- grupo pomada concentração 100 µg/mL; D- Grupo pomada concentração	
6	200 µg/mL; E- Grupo pomada concentração 300 µg/mL; F- Grupo pomada concentração 400 µg/mL;	
7	G- Grupo pomada concentração 500 µg/mL; H- Grupo pomada concentração 600 µg/mL; I- Grupo	
8	pomada concentração 700µg/mL; J e K- Grupos controles pomada com a base pura. ....	71
9	<b>Figura 26.</b> Comparação do número total de UFC antes e após o tratamento com as pomadas orabase	
10	(200µg/mL; 300µg/m; 400µg/mL) na mucosa oral de pacientes após 15 dias de uso. ....	72
11	<b>Figura 27.</b> Aspectos clínicos da mucosa oral antes e após o uso das pomadas contendo cinamaldeído	
12	nas concentrações de 200, 300 e 400µg/mL. ....	73
13	<b>Figura 28.</b> Análise das células escamosas bucais. A- 200µg/mL antes; B- 300µg/mL antes; C-	
14	400µg/mL antes; D- 200µg/mL depois; E- 300µg/mL depois; F- 400µg/mL depois. ....	74
15		

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Efeitos do cinamaldeído nos parâmetros de desenvolvimento do peixe-zebra após 96hpf...68	
<b>Tabela 2.</b> Efeito da administração de dose única de cinamaldeído (4 mg/kg) e ciclofosfamida (50 mg/kg) no número de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos após 48 horas do tratamento. ....70	
<b>Tabela 3.</b> Características do uso de dentaduras e sintomas nos participantes de cada grupo .....72	

## Sumário

1 INTRODUÇÃO .....	20
2 OBJETIVOS.....	23
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	23
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	23
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	25
<b>3.1 Infecções fúngicas</b> .....	25
<b>3.2 Farmacoterapia das infecções fúngicas</b> .....	32
<b>3.3 Produtos naturais e cinamaldeído</b> .....	38
<b>3.4 Modelos para estudos da toxicologia/farmacologia de fármacos com potencial antifúngico</b> .....	41
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	45
<b>4.1 Etapas gerais do estudo</b> .....	45
<b>4.2 Locais da pesquisa</b> .....	46
<b>4.3 Ensaio <i>in vitro</i></b> .....	46
4.3.1 Estudo do efeito do cinamaldeído sobre a micromorfologia de cepas de <i>C. albicans</i> ATCC 90028 e <i>C. krusei</i> ATCC 6258 .....	46
4.3.2 Estudo do efeito do cinamaldeído sobre a redução do biofilme de cepas do gênero <i>Candida</i> spp.....	47
4.3.3 Citotoxicidade em eritrócitos humanos.....	48
4.3.4 Teste de susceptibilidade fúngica.....	48
<b>4.4 Ensaio <i>in vivo</i></b> .....	49
4.4.1 Animais e comitê de ética .....	49
4.4.2 Toxicidade aguda usando larvas de <i>Galleria mellonella</i> .....	50
4.4.2 Toxicidade aguda usando embriões de peixe-zebra .....	50
4.4.3 Genotoxicidade.....	51
4.4.4 Estudo de toxicidade em mucosa oral ceratinizada de ratos .....	51
<b>4.5 Ensaio clínico fase I</b> .....	53
4.5.1 Considerações Éticas e Registro Primário do Ensaio:.....	53
4.5.2 Desenho do estudo .....	53
4.5.3 Participantes .....	53
4.5.4 Delineamento do estudo .....	53
4.5.5 Amostra .....	55
4.5.6 Intervenções .....	55
4.5.7 Concordância intra-examinadores:.....	58
<b>4.6 Análise estatística</b> .....	58
5 RESULTADOS .....	60

<b>5.1 Ensaios <i>in vitro</i></b> .....	60
5.1.1 Estudo do efeito do cinamaldeído sobre a micromorfologia de cepas de <i>C. albicans</i> ATCC 90028 e <i>C. krusei</i> ATCC 6258 .....	60
5.1.2 Estudo do efeito do cinamaldeído sobre a redução do biofilme de cepas do gênero <i>Candida</i> spp.....	62
5.1.3 Teste de susceptibilidade fúngica.....	63
5.1.4 Citotoxicidade em eritrócitos humanos .....	65
<b>5.2 Ensaios <i>in vivo</i></b> .....	65
5.2.1 Toxicidade em larvas de <i>Galleria mellonella</i> .....	65
5.2.2 Toxicidade em embriões de peixe-zebra .....	66
5.2.3 Avaliação da genotoxicidade.....	70
5.2.4 Estudo de toxicidade em mucosa oral ceratinizada de ratos .....	70
<b>5.3 Ensaio clínico fase I</b> .....	71
6 DISCUSSÃO.....	76
7 CONCLUSÕES.....	82
8 REFERÊNCIAS .....	83
<b>ANEXOS</b> .....	94
ANEXO 1 – Parecer consubstanciado da Comissão de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde (CEP/CCS).....	94
ANEXO 2 – Pedido de patente depositado no Instituto Nacional da Propriedade Intelectual (INPI) .....	95
ANEXO 3 - Certidão de aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) .....	96

# *Introdução*

# 1 INTRODUÇÃO

2 A frequência mundial das infecções fúngicas aumentou nos últimos anos, especialmente  
3 em indivíduos imunossuprimidos (LOCKHART; GUARNER, 2019). Essas infecções podem  
4 se apresentar de forma superficial, mas também podem representar um indicativo de uma  
5 doença sistêmica grave (TELLES; KARKI; MARSHALL, 2017). Um risco recente para o  
6 desenvolvimento de superinfecções é o aumento do número de pacientes com síndrome  
7 respiratória aguda decorrente da infecção por SARS-CoV-2 (ARASTEHFAR et al., 2020). As  
8 infecções fúngicas invasivas, frequentemente observadas em pacientes hospitalizados, são  
9 decorrentes, em geral, da presença de espécies de *Candida*, e estão associadas a uma taxa de  
10 mortalidade que pode chegar a 70%. Esse tipo de infecção é cada vez mais reconhecidas como  
11 uma complicação de COVID-19 grave (ARASTEHFAR et al., 2020).

12 Quando a ocorrência é na cavidade oral, a patogênese ainda não é totalmente  
13 compreendida, mas uma variedade de fatores tem sido associada ao crescimento excessivo  
14 da *Candida* (SERRANO et al., 2020). Quando está associada ao uso de prótese, é denominada  
15 candidíase eritematosa atrófica crônica ou estomatite protética. Isso ocorre porque as próteses  
16 geralmente ocluem a mucosa oral e inibem o fluxo salivar, levando ao supercrescimento do  
17 microrganismo (MILLSOP; FAZEL, 2016).

18 Em virtude da escassez de classes distintas de antifúngicos, bem como o surgimento e  
19 disseminação de patógenos multirresistentes, os antimicrobianos convencionais estão se  
20 tornando cada vez mais ineficazes no combate a doenças infecciosas (LEE et al., 2020),  
21 impulsionando, com isso, o interesse crescente pela descoberta de fármacos alternativos com  
22 melhor eficácia e menor toxicidade. Neste contexto, os produtos naturais apresentam-se como  
23 excelente alternativa no combate às infecções fúngicas, sendo constituídos majoritariamente  
24 por compostos biologicamente ativos (YADAV et al., 2016), dentre os quais, destacamos o  
25 cinamaldeído (CN) extraído das folhas e casca da *Cinnamomum zeylanicum* Blume (canela)  
26 (DOYLE; STEPHENS, 2019).

27 A literatura já comprovou atividade antimicrobiana (DOYLE; STEPHENS, 2019),  
28 antiinflamatória (MATEEN et al., 2019) e reparadora tecidual (DAEMI et al., 2019) do  
29 cinamaldeído isolado. Na forma tópica, ele foi testado em modelo *in vivo* no tratamento de  
30 feridas de pele decorrentes de infecções por *Pseudomonas aeruginosa* (FERRO et al., 2019) e  
31 nas cicatrizações de feridas em camundongos diabéticos (DAEMI et al., 2019). Além desses  
32 estudos em animais, também foi avaliado em humanos através de um ensaio clínico que  
33 analisou a eficácia de um enxaguatório bucal contendo óleo essencial (OE) de *Cinnamomum*

1 *zeylanicum* Blume, que contém cinamaldeído em sua composição química, comprovando que  
2 o produto exibiu eficácia clínica no tratamento da candidíase oral (DE ARAÚJO et al., 2021).  
3 Contudo, o uso do cinamaldeído isolado na forma de pomada em orabase nesse tipo de  
4 tratamento, com uso em mucosa bucal, ainda não havia sido testado.

5 Comprovamos a atividade antifúngica do cinamaldeído na forma isolada frente às  
6 espécies do gênero *Candida* spp., com provável mecanismo de ação relacionado à complexação  
7 do ergosterol. Além disso, verificamos que esse composto promoveu viabilidade celular frente  
8 à queratinócitos até a concentração de 946 $\mu$ M (DA NÓBREGA ALVES et al., 2020). Esses  
9 resultados impulsionaram a realização deste estudo, que incorpora a hipótese de que o  
10 cinamaldeído é capaz de reduzir biofilme de *Candida* spp. e alterar a micromorfologia fúngica.  
11 Esses efeitos são importantes pois as infecções fúngicas na cavidade oral, muitas vezes,  
12 relacionam-se com a formação de biofilme multiespécie (WALL et al., 2019).

13 Porém, para além da avaliação do efeito farmacológico de interesse, é preciso considerar  
14 que a toxicidade dos compostos representa um grande desafio no desenvolvimento de  
15 medicamentos pela indústria farmacêutica, visto que muitos produtos com aplicação em saúde,  
16 têm o potencial de causar efeitos indesejáveis (FRENZEL; TESCHKE, 2016). Assim, este  
17 estudo objetivou avaliar, além da atividade antifúngica, possíveis efeitos tóxicos do  
18 cinamaldeído na forma isolada e incorporado a uma formulação farmacêutica de pomada  
19 orabase em modelos de estudo *in vitro*, *in vivo* e clínico em seres humanos. Foram testadas  
20 hipóteses que consideram o efeito antifúngico por intermédio de inibição de fatores de  
21 virulência (inibição de formação de estruturas fúngicas e de biofilme), ausência de toxicidade  
22 sobre células humanas e de animais, e sobre organismos invertebrado (*Galleria mellonella*) e  
23 vertebrado (embriões de *Danio rerio*). Além disso, foi testada a hipótese de segurança de uma  
24 formulação farmacêutica de pomada em orabase contendo cinamaldeído, em diferentes  
25 concentrações, em ratos e seres humanos.

26

27

28

# *Objetivos*

## 1 2 OBJETIVOS

### 2 2.1 Objetivo geral

3 Avaliar a atividade antifúngica e investigação da segurança do cinamaldeído na forma  
4 isolada e de pomada orabase através de um estudo *in vitro*, *in vivo* e clínico fase I.

### 5 2.2 Objetivos específicos

- 6  Verificar os efeitos do cinamaldeído na micromorfologia fúngica;
- 7  Avaliar o efeito do cinamaldeído em reduzir o biofilme de *Candida* spp.;
- 8  Avaliar a atividade citotóxica do cinamaldeído sobre eritrócitos humanos;
- 9  Definir o perfil de toxicidade do cinamaldeído frente a sobrevivência das larvas de  
10 *Galleria mellonella*;
- 11  Determinar o efeito do cinamaldeído no desenvolvimento de embriões de *Danio rerio*  
12 (peixe-zebra);
- 13  Avaliar a genotoxicidade do cinamaldeído através da observação do número de  
14 eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos;
- 15  Definir o grau de sensibilidade da cepa de *Candida albicans* ATCC 90028 frente à  
16 pomada orabase contendo cinamaldeído;
- 17  Avaliar a segurança do cinamaldeído na forma de pomada em mucosa bucal  
18 queratinizada de ratos;
- 19  Avaliar a segurança e tolerabilidade da pomada em orabase contendo cinamaldeído, em  
20 humanos, através de um ensaio clínico fase I, descrevendo seus possíveis efeitos  
21 adversos.

22

23

24

25

26

# *Revisão da literatura*

## 3 REVISÃO DA LITERATURA

### 3.1 Infecções fúngicas

A diversidade de micro-organismos envolvidos, bem como a frequência mundial das infecções fúngicas, aumentaram nos últimos anos (LOCKHART; GUARNER, 2019), sendo uma ameaça crescente à saúde pública global (STRICKLAND; SHI, 2021). Um risco recente para o desenvolvimento de superinfecções é o aumento do número de pacientes com síndrome respiratória aguda decorrente da pandemia causada pelo coronavírus. Essas infecções fúngicas invasivas também são acometidas por espécies de *Candida* com uma taxa de mortalidade chegando a 70% e são cada vez mais reconhecidas como uma complicação de COVID-19 grave. Isso se deve ao tempo prolongado na Unidade de Terapia Intensiva (UTI), uso de cateteres venosos centrais e utilização de antibióticos de largo espectro. Esse tipo de infecção é de difícil diagnóstico e requer, muitas vezes, uma combinação de técnicas sorológicas e moleculares para identificação microbiana (ARASTEHFAR et al., 2020).

Espécies de *Candida* são comumente encontradas no trato gastrointestinal de humanos, na flora da pele e em mucosas. A forma leveduriforme não é patogênica e permanece em equilíbrio para não progredir e provocar infecção (TELLES; KARKI; MARSHALL, 2017). Em pacientes saudáveis, a infecção desencadeada na mucosa é leve e superficial. Contudo, embora não estejam associadas a uma alta mortalidade, essas infecções superficiais podem levar a uma candidíase sistêmica na medida em que os pacientes precisam fazer uso de procedimentos médicos complexos, como o uso de cateteres, cirurgia intestinal ou transplante de fígado. Essas infecções disseminadas são a quarta infecção nosocomial da corrente sanguínea mais comum, e têm alta mortalidade associada de 45-75% (PELLON; SADEGHI NASAB; MOYES, 2020).

Dentre as mais de 200 espécies de *Candida*, a mais comum é a *Candida albicans* (*C. albicans*) (SERRANO et al., 2020; TELLES; KARKI; MARSHALL, 2017). Esta, é responsável por mais de 90% dos isolados da cavidade oral. Além da *C. albicans*, outras espécies patogênicas também são encontradas, tais como *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae*. *Candida* spp. está presente em 25% a 75% da população na ausência de qualquer lesão (ALRAYYES et al., 2019; GACON; LOSTER; WIECZOREK, 2019; SHIRAZI et al., 2019).

A patogênese das infecções fúngicas da cavidade oral ainda não é totalmente compreendida, mas uma variedade de fatores tem sido associada ao crescimento excessivo de *Candida*. Os fatores locais mais comumente relacionados são: xerostomia (síndrome de Sjogren (Serrano et al., 2020), desidratação, radiação, polifarmácia (TELLES; KARKI;

1 MARSHALL, 2017) , uso de cigarro (MUN et al., 2016), uso de antibióticos de largo espectro,  
2 dieta rica em carboidrato (SERRANO et al., 2020; TELLES; KARKI; MARSHALL, 2017) ,  
3 leucoplasia oral (SHIRAZI et al., 2019), uso de prótese (BIANCHI et al., 2016; SERRANO et  
4 al., 2020), má higiene oral (ALRAYYES et al., 2019) . Os fatores sistêmicos comumente  
5 envolvidos com esse processo infeccioso são: idade avançada (SHIRAZI et al., 2019), diabetes  
6 (MARTORI et al., 2017; SERRANO et al., 2020) , imunossupressão (SERRANO et al., 2020;  
7 SHIRAZI et al., 2019), deficiência nutricional e câncer (TELLES; KARKI; MARSHALL,  
8 2017).

9 Essa variedade de fatores predisponentes promove alteração do ambiente e favorece a  
10 proliferação da *Candida*, levando à sua transição de comensal para patogênica, a qual pode se  
11 manifestar com sinais e sintomas clínicos de candidíase oral (HERTEL et al., 2016). Além  
12 disso, esses fatores desencadeiam a neutropenia, disfunção qualitativa dos neutrófilos,  
13 disfunção do sistema imunológico mediado por células e ruptura da integridade da mucosa  
14 (SULEYMAN; ALANGADEN, 2016; TELLES; KARKI; MARSHALL, 2017).

15 Limitações dos testes de diagnóstico e o surgimento de patógenos fúngicos resistentes,  
16 tornam a prevenção de infecções fúngicas cada vez mais importante (LEUNG et al., 2008;  
17 SULEYMAN; ALANGADEN, 2016). A melhor maneira de tratar uma infecção bucal por  
18 *Candida* é prevenindo sua recorrência, seja através da mudança nos hábitos de higiene, do  
19 controle de doenças sistêmicas, como diabetes, ou o uso de próteses dentárias com boas  
20 condições de uso (TELLES; KARKI; MARSHALL, 2017). A infecção mais comumente  
21 encontrada é a candidíase pseudomembranosa. Além desta, existem outras formas de candidíase  
22 que afeta a região maxilofacial, são elas: queilite angular, glossite romboidal mediana,  
23 candidíase hiperplásica crônica, atrófica crônica (estomatite protética), mucocutânea crônica e  
24 candidíase multifocal crônica (TELLES; KARKI; MARSHALL, 2017).

25 Quando esse tipo de infecção está associado ao uso de prótese, é denominada candidíase  
26 atrófica crônica ou estomatite protética. Isso ocorre porque as próteses geralmente ocluem a  
27 mucosa oral e inibem o fluxo salivar, levando ao supercrescimento de *Candida*. A estomatite  
28 protética apresenta-se clinicamente como lesões eritematosas, edematosas e caracteristicamente  
29 restritas a mucosa oral em contato com a prótese. A sintomatologia é geralmente ausente, mas  
30 os pacientes podem queixar-se de feridas (queilite angular) e queimação. Classifica-se como  
31 tipo I (petéquias no palato de forma pontual); tipo II (eritema da mucosa na área de suporte da  
32 prótese); tipo III (mucosa hiperplásica em contato com a prótese) (figura 1) (MILLSOP;  
33 FAZEL, 2016).

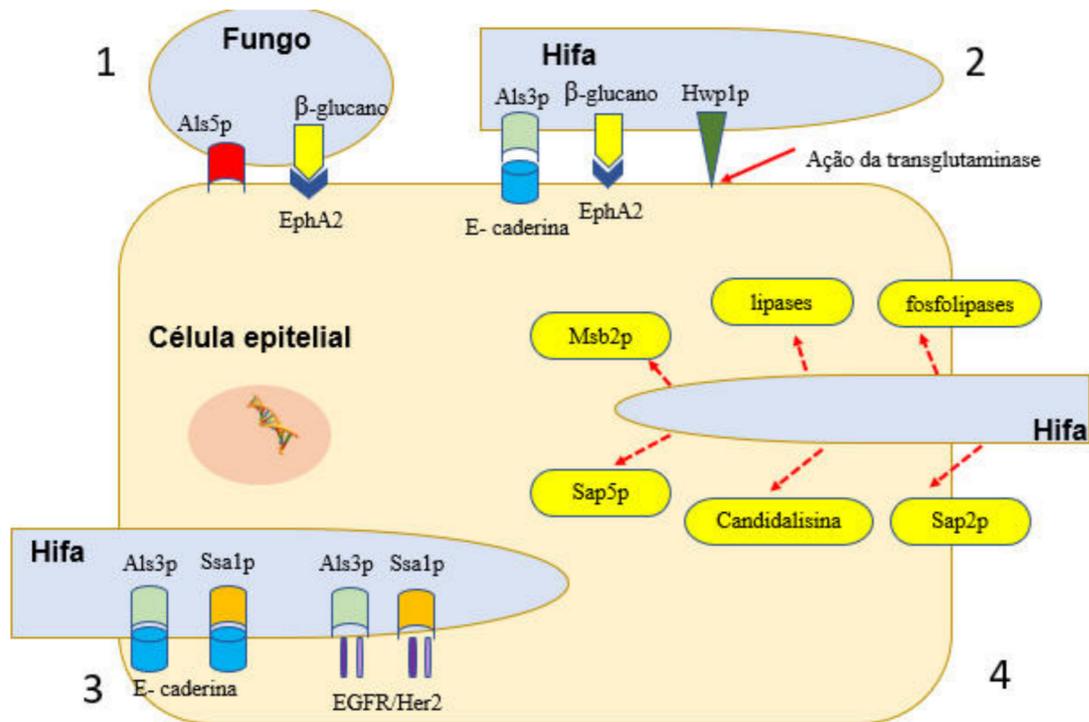


1  
2 **Figura 1.** Aspectos clínicos da estomatite protética. A – Estomatite tipo I; B – Estomatite tipo II; C –  
3 Estomatite tipo III. \* Fotos autorizadas pelo paciente e de responsabilidade do grupo de pesquisa  
4 coordenado pelo Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro.

5 As espécies de *Candida* possuem atributos de virulência, permitindo-lhes invadir  
6 quando surgem oportunidades e causar várias infecções em humanos, especialmente quando o  
7 sistema imunológico está prejudicado (ARASTEHFAR et al., 2020). A invasão da *Candida*  
8 pode ser por dois mecanismos – endocitose induzida através da interação de proteínas das  
9 leveduras (Ssa1p e Als3p) em proteínas das células epiteliais (caderinas e EGFR / Her2) ou por  
10 penetração ativa decorrente do crescimento direto da ponta da hifa a qual leva ao dano celular  
11 (PELLON; SADEGHI NASAB; MOYES, 2020).

12 A adesão de *C. albicans* a uma superfície mucosa é um requisito essencial para sua  
13 persistência no hospedeiro, seja como comensal ou como patógeno. As interações iniciais  
14 acontecem através de forças de *Van der Waals* e interações hidrofóbicas. Uma vez fixada, as  
15 leveduras interagem com a fibronectina humana, proteínas salivares ricas em prolina e  
16 carboidratos que facilitam a adesão às células epiteliais esofágicas e bucais humanas. Contudo,  
17 a maior contribuição para a adesão fúngica é conferida pelas adesinas. As mais estudadas são  
18 da família de proteínas da sequência semelhante à aglutinina (Als). A tipo 5 (Als5) medeia a  
19 adesão inicial de células de levedura de *C. albicans* a células epiteliais bucais humanas e a  
20 resíduos de treonina, serina e alanina localizados dentro de fibronectina, colágeno tipo IV e  
21 laminina. Já o  $\beta$ -glucano da fase de levedura é reconhecido pelo receptor não clássico de  
22 padrões EphA<sub>2</sub> durante essa interação inicial, conforme pode ser visto na figura 2.1 (HOYER;  
23 COTA, 2016; NIKOU et al., 2019; PELLON; SADEGHI NASAB et al., 2020).

24



1

2 **Figura 2.** Interações de *Candida albicans* com células epiteliais do hospedeiro. (1) Interações iniciais;  
 3 (2) Transição para a morfologia das hifas; (3) A internalização das hifas de *C. albicans*; (4) Secreção  
 4 dos fatores de virulência. Adaptado de Nikou et al., 20.

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

Uma vez ligada à superfície da mucosa, a transição para a morfologia das hifas resulta na expressão de adesinas adicionais, incluindo Als3p e Hwp1p, as quais consolidam a adesão epitelial através da interação com a E-caderina e enzimas transglutaminases do hospedeiro, respectivamente (Figura 2.2). A internalização epitelial de hifas de *C. albicans* é mediada pelas invasinas Als3p e Ssa1p que interagem com a E-caderina e um complexo receptor heterodimérico que compreende o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e o receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (Her2) de forma passiva (figura 2.3) (HÖFS; MOGAVERO; HUBE, 2016; NIKOU et al., 2019). Enquanto em contato com a superfície da mucosa, *C. albicans* secreta um arsenal de fatores de virulência incluindo a toxina peptídica candidalisina, proteinases aspárticas secretoras (Saps), lipases e fosfolipases que facilitam a patogenicidade. A proteína Msb2p é liberada no ambiente extracelular para neutralizar a atividade de vários peptídeos antimicrobianos do hospedeiro (figura 2.4) (NIKOU et al., 2019; PELLON; SADEGHI NASAB et al., 2020).

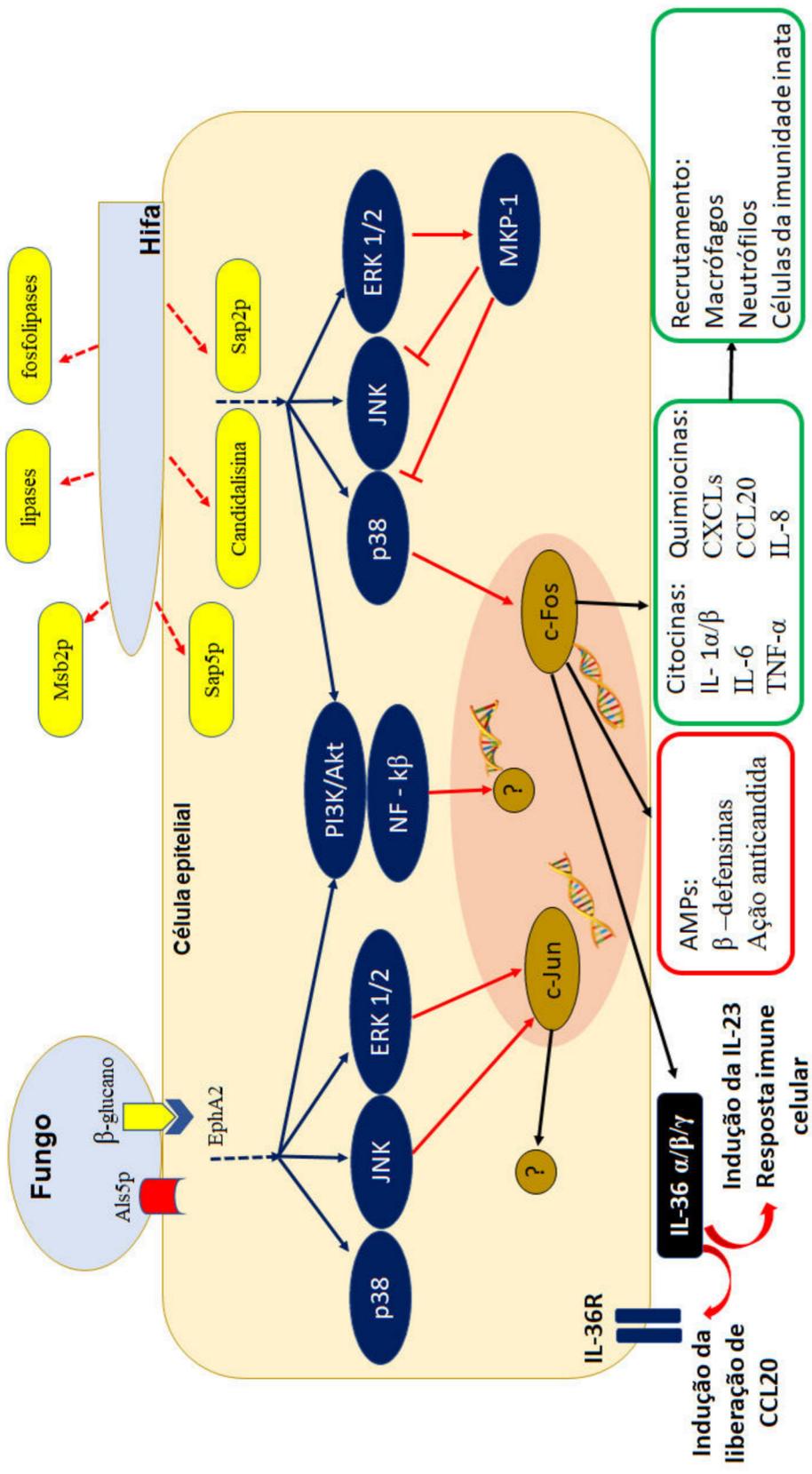
Conforme visto acima, esse reconhecimento da *C. albicans* pelas células epiteliais é mediado pelo receptor  $\beta$ -glucano-Eph2A, levando à ativação de células epiteliais e secreção da toxina hifal candidalisina. Toda essa interação fungo-célula epitelial, leva à ativação da via MAPK intracelular. As células de levedura ativam PI3K/AKT e NF- $\kappa$ B, além da ativação de

1 forma mais fraca de p38, JNK e ERK1/2. Com o desenvolvimento das hifas e a liberação de  
2 candidalinas na bolsa de infecção, fazem com que essas ativações intracelulares sejam mais  
3 fortes e sustentadas. Quando a interação é fraca, leva a ativação de c-jun com consequências  
4 transcricionais ainda desconhecidas, mas quando ocorre a ativação forte pelas hifas, induz à  
5 ativação de c-fos o que faz com que ocorra a liberação de moléculas pró-inflamatórias (IL-1 $\alpha/\beta$ ,  
6 IL-6, TNF- $\alpha$ , CXCLs, CCL20, IL-8) e peptídeos antimicrobianos ( $\beta$ -defensinas) com o objetivo  
7 de debelar a invasão fúngica e recrutar mais células imunológicas (neutrófilos, macrófagos e  
8 IL-17) para os focos de infecção (figura 3) (PELLON et al., 2020; VERMA et al., 2017).

9         Recentemente, foi demonstrada a indução da IL-36 por intermédio da *C. albicans* em  
10 células epiteliais através da liberação de candidalinas. Essa interleucina é de fundamental  
11 importância para a eliminação adequada do fungo (PELLON et al., 2020), principalmente em  
12 infecções de mucosa (HEATH et al., 2019). É importante ressaltar que os membros da IL-36  
13 fazem parte da superfamília da IL-1 e estão surgindo como importantes mediadores da resposta  
14 imune a infecções microbianas e doenças inflamatórias (BUHL; WENZEL, 2019; JENSEN,  
15 2017). Existem três citocinas agonistas da IL-36 (IL-36 $\alpha$ , IL-36 $\beta$  e IL-36 $\gamma$ ), e uma molécula  
16 antagonista, IL-36RA, todas sinalizando através do dímero composto por IL-36R e proteína  
17 acessória IL-1R com a finalidade de ativar monócitos, células dendríticas, queratinócitos,  
18 fazendo com que ocorra o recrutamento de leucócitos (figura 3) (BASSOY; TOWNE; GABAY,  
19 2018; SWINDELL et al., 2018).

20

1



2

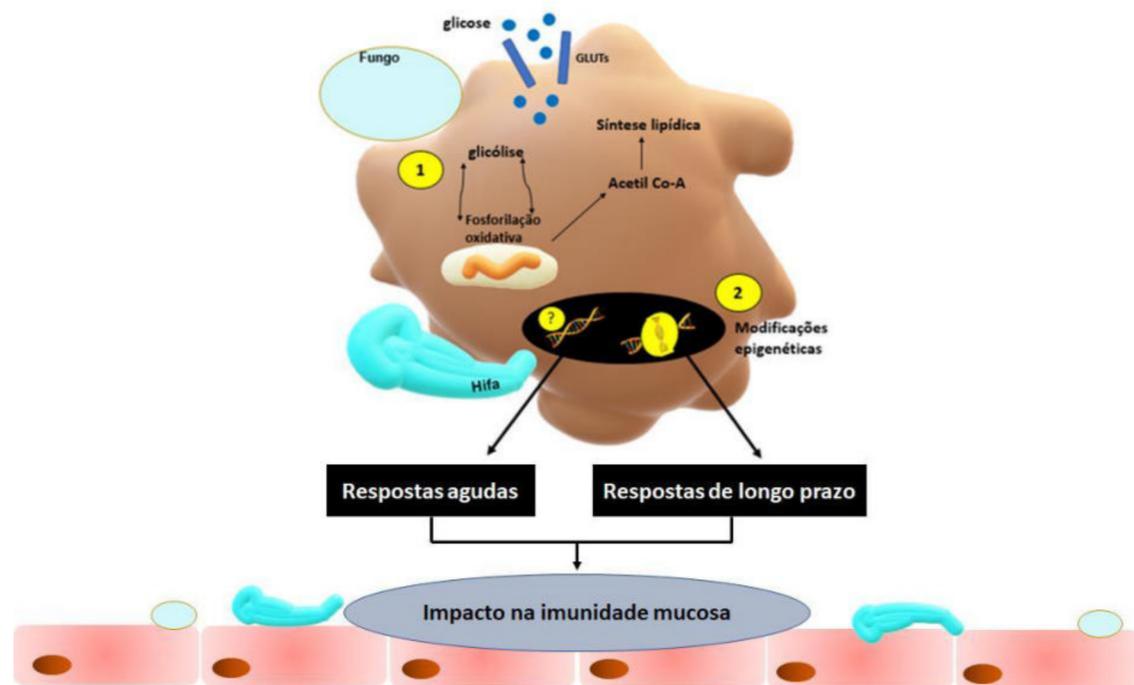
**Figura 3.** Imunidade inata da mucosa a *Candida albicans*. Adaptado de Pellon, Nasab, Moyes, 2020.

3

4

1 As respostas mediadas pela IL-17 estão relacionadas com infecções fúngicas na  
 2 cavidade oral e são inespecíficas para vulvovaginal. Contudo, o seu papel durante a candidíase  
 3 mucosa em humanos não é completamente conhecido. A sinalização da IL-1 promove a indução  
 4 da IL-17 com o objetivo de inibir da liberação de citocinas/quimiocinas, comprometimento do  
 5 recrutamento de neutrófilos e, conseqüentemente, aumento da carga fúngica (ALTMEIER et  
 6 al., 2016; PELLON et al., 2020; VERMA et al., 2017).

7 Alterações genômicas tais como aneuploidias, perda de heterozigidade e rearranjos  
 8 cromossômicos podem afetar a expressão de alvos de fármacos, bombas de efluxo e outros  
 9 fatores que contribuem para resistência do fungo aos antimicrobianos (LEE et al., 2020). Para  
 10 as células imunológicas montarem respostas antimicrobianas eficazes, elas precisam mudar o  
 11 metabolismo celular, pois os ligantes microbianos regulam positivamente a captação de glicose  
 12 e seu metabolismo anaeróbico para se obter energia e impulsionar os mecanismos  
 13 antimicrobianos e a produção de citocinas (KASMI; STENMARK, 2015; PELLON; SADEGHI  
 14 NASAB; MOYES, 2020), contudo, a células estimuladas por hifas respondem em menor grau  
 15 (DOMÍNGUEZ-ANDRÉS et al., 2017). Isso ocorre porque a glicose é a fonte de carbono  
 16 preferida para *C. albicans* durante a colonização e patogênese (figura 4) (TRAVEN;  
 17 NADERER, 2019).



19  
 20 **Figura 4.** Remodelação epigenética de células imunes, levando ao desenvolvimento de respostas agudas  
 21 ou de longo prazo. Adaptado de Pellon, Nasab, Moyes, 2020.

### 1 3.2 Farmacoterapia das infecções fúngicas

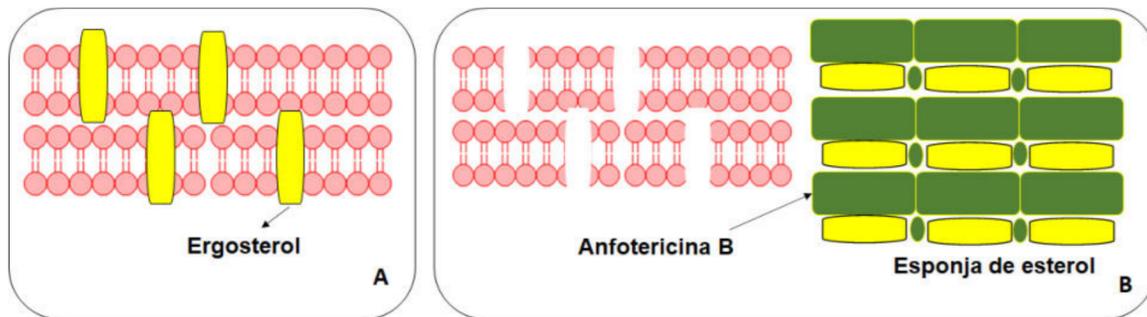
2 O impacto dos fungos na saúde humana é amplificado pelo fato de que apenas três  
3 classes de medicamentos antifúngicos estão disponíveis para tratar infecções fúngicas (REVIE  
4 et al., 2018). Isso se deve ao amplo período destinado ao desenvolvimento de novos fármacos  
5 frente à natureza eucariótica das células fúngicas. Dada a escassez de classes distintas de  
6 antifúngicos para o tratamento de infecções e o surgimento e disseminação de patógenos  
7 fúngicos multirresistentes, os antimicrobianos convencionais estão se tornando cada vez mais  
8 ineficazes no combate a doenças infecciosas (LEE et al., 2020). O termo resistência pode ser  
9 aplicado a uma cepa microbiana que tem uma concentração inibitória mínima (CIM) para um  
10 determinado antifúngico acima dos pontos de corte clínicos específicos. Este termo não deve  
11 ser confundido com tolerância, que é a capacidade de uma cepa fúngica suscetível a fármacos  
12 de crescer na presença de um antifúngico em concentrações acima da CIM (BERMAN;  
13 KRYSAN, 2020).

14 As classes de antifúngicos utilizados na terapêutica convencional são: derivados  
15 polienos, que se ligam ao ergosterol na membrana celular fúngica levando à lise celular; os  
16 azóis, que tem como alvo a biossíntese do ergosterol; e as equinocandinas, que atuam inibindo  
17 a biossíntese da parede celular fúngica (REVIE et al., 2018). A nistatina, na forma de suspensão  
18 oral, e o miconazol, disponibilizado em gel, são os comumente utilizados na prática clínica  
19 odontológica. A terapia sistêmica só é indicada nos casos de insucesso dessas formas tópicas  
20 (MANIK; BAHL, 2017). Na ocorrência de infecções graves, as equinocandinas e azóis são os  
21 principais antifúngicos utilizados, mas as falhas terapêuticas, atribuídas aos mecanismos de  
22 virulência e resistência de *Candida* spp. como *C. auris* e *C. glabrata*, apelam para o  
23 desenvolvimento de novos medicamentos antifúngicos com novos mecanismos de ação  
24 (ARASTEHFAR et al., 2020).

25 Os polienos são moléculas anfipáticas naturais e representam a classe mais antiga de  
26 medicamentos antifúngicos usados para tratar infecções sistêmicas. O representante  
27 comumente usado é a anfotericina B. Antes, pensava-se que este fármaco se ligava diretamente  
28 ao ergosterol da membrana fúngica, formando complexos que se intercalavam na mesma,  
29 promovendo extravazamento de componentes intracelulares, culminando com a morte celular.  
30 Contudo, hoje foi esclarecido que anfotericina B forma, na verdade, agregados  
31 extramembranosos que extraem ergosterol das membranas celulares dos fungos, atuando como  
32 um fungicida através da formação de uma “Esponja de esterol” (figura 5). A anfotericina B tem  
33 como característica a baixa biodisponibilidade oral e efeitos tóxicos decorrente da semelhança

1 do colesterol e ergosterol (LEE et al., 2020). Esses efeitos tóxicos incluem hepatotoxicidade  
2 (KYRIAKIDIS et al., 2017) e nefrotoxicidade (SALES; FORESTO, 2020).

3

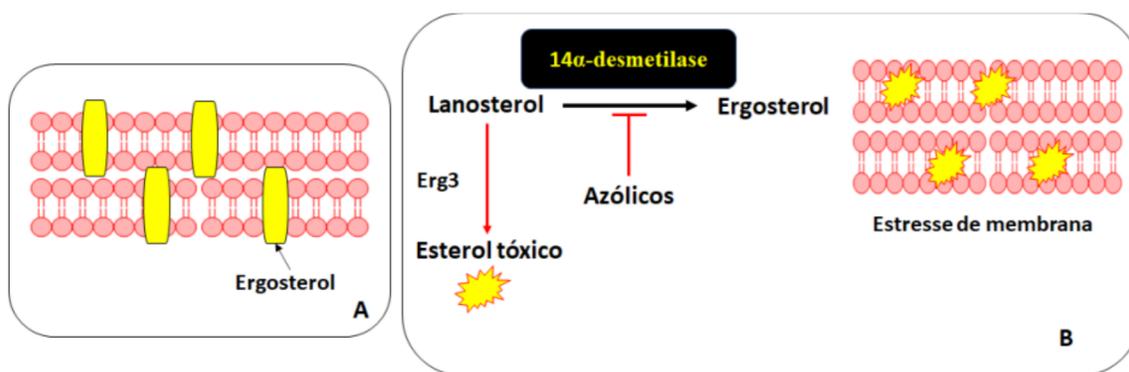


4

5 **Figura 5.** Mecanismo de ação dos polienos. A. membrana fúngica. B. Membrana fúngica após ação da  
6 anfotericina B com formação da esponja de esterol (anfotericina B + ergosterol). Adaptado de Lee et  
7 al., 2020.

8 Os azóis representam outra classe de fármacos bastante utilizadas. Eles são compostos  
9 sintéticos heterocíclicos com função de bloquear a síntese do ergosterol, levando a rupturas na  
10 membrana, alterando sua estabilidade, permeabilidade e função. Os fármacos que pertencem a  
11 esta classe atuam especificamente na enzima 14- $\alpha$  desmetilase, a qual faz parte do citocromo  
12 P450. Ela é codificada pelo gene ERG11 presente em espécies fúngicas do gênero *Candida*  
13 (figura 6). Os azóis apresentam excelente biodisponibilidade por via oral, além de também  
14 estarem disponíveis para uso intravenoso. Contudo, possui a desvantagem de interagir com  
15 outras fármacos, pois também inibem o citocromo P450 de mamíferos, o qual é responsável  
16 pelo metabolismo desses fármacos (LEE et al., 2020).

17

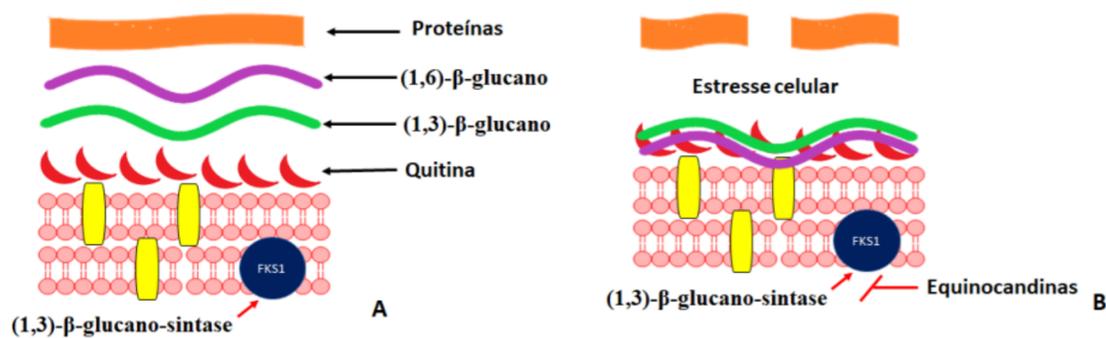


18

19 **Figura 6.** Mecanismo de ação dos azóis. A. membrana fúngica. B. Membrana fúngica após ação da azol.  
20 O lanosterol se transformou em esterol tóxico provocando estresse na membrana Adaptado de Lee et  
21 al., 2020.

22 A classe de fármacos mais recentes a entrar na área médica nos últimos anos são as  
23 equinocandinas. São derivados de produtos naturais compostos por um núcleo hexapeptídico

1 cíclico com uma cadeia lateral N-ligada de ácido graxo. Atua na enzima (1,3) - $\beta$ -glucano-  
 2 sintase responsável pela síntese da parede celular, a qual é uma estrutura totalmente ausente em  
 3 células de mamíferos. Esta enzima é codificada pelo gene FKS1 em *C. albicans* e FKS1 e FKS2  
 4 em *C. glabrata*. São reconhecidas como a primeira linha de tratamento para candidíases  
 5 invasivas, contudo, são ineficazes contra espécies de *Cryptococcus*. Suas principais vantagens  
 6 são o excelente perfil de segurança, maior seletividade fúngica e baixo potencial para interações  
 7 medicamentosas. Tem como desvantagens o seu uso clínico ser limitado ao uso intravenoso da  
 8 mesma forma que a anfotericina B (figura 7) (LEE et al., 2020).



11 **Figura 7.** Mecanismo de ação das equinocandinas. Elas impedem a síntese de (1,3) - $\beta$ -glucano  
 12 resultando em perda de integridade e estresse severo da parede celular. A- Célula fúngica normal. B-  
 13 Estresse celular decorrente do bloqueio da enzima (1,3) - $\beta$ -glucano sintase, a qual é responsável pela síntese  
 14 da parede celular. Adaptado de Lee et al., 2020.

16 Além desse número limitado e do aumento da prevalência de infecções graves causadas  
 17 por *Candida* spp. (VAN DAELE et al., 2019), outros fatores também são motivadores na busca  
 18 de novos fármacos, dentre os quais temos o aumento da resistência tanto a fármacos únicas  
 19 (*Aspergillus*) como múltiplas (*C. glabrata* e *C. auris*) (PERLIN; RAUTEMAA-  
 20 RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017; PRASAD; NAIR; BANERJEE, 2019),  
 21 muitas vezes decorrentes à terapia repetida ou de longo prazo (PERLIN; RAUTEMAA-  
 22 RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017). A resistência antifúngica está em  
 23 ascensão e é uma emergente ameaça ao manejo do paciente e ao sucesso clínico (PERLIN;  
 24 RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017).

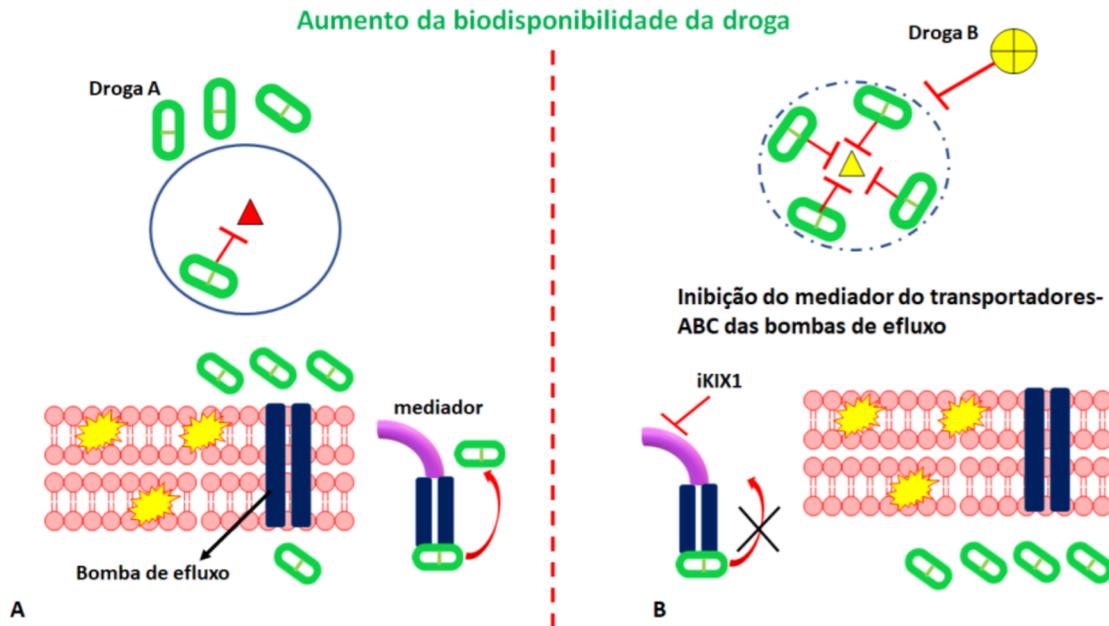
25 O mais comum mecanismo de resistência aos azóis é a regulação positiva das bombas  
 26 de efluxo as quais diminuem a concentração dos fármacos dentro das células. Elas são reguladas  
 27 pelos genes Tac136 e Mrr137 em *C. albicans* e CgPdr1 em *C. glabrata*, bem como mutações  
 28 pontuais na superexpressão do gene *ERG11* e *Cyp51A/Cyp51B*. Todas essas alterações fazem  
 29 com que o fungo desenvolva alta plasticidade genômica, resultado em perda de

1 heterozigossidade, aumento do número de cópias cromossômicas, aneuploidia ou formação de  
2 isocromossomo, os quais afetam a expressão do alvo do azol (EL-HOUSSAINI et al., 2019;  
3 LEE; PUUMALA et al., 2020; PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON et al., 2017).

4 Esses mecanismos que causam resistência aos azóis não têm resistência cruzada com os  
5 que causam com as equinocandinas. Nestas, a resistência é devido a alterações nos genes FKS1  
6 e FKS2 (LEE et al., 2020; PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-  
7 IZQUIERDO, 2017; ROBBINS; CAPLAN; COWEN, 2017). Já com os polienos, a resistência  
8 se deve às alterações nos genes envolvidos com a biossíntese do ergosterol, tais como ERG1,  
9 ERG2, ERG3, ERG4, ERG6 e ERG11 (EL-HOUSSAINI; ELNABAWY; NASSER;  
10 ELKHATIB, 2019; PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO,  
11 2017).

12 Estratégias são desenvolvidas para contornar esse aumento da resistência microbiana.  
13 Tais estratégias incluem: o uso de terapia combinada; o desenvolvimento de agentes  
14 antivirulência e modulação das respostas imunes do hospedeiro. Tem-se como exemplo de  
15 agentes antivirulência, a filastatina, que é responsável pela inibição da filamentação, adesão de  
16 superfície e formação de biofilme. Já a modulação se dá com a vacina anti-*Candida* NDV-3A  
17 a qual emprega a adesina e invasina Als3 como antígeno para induzir a resposta imune  
18 adaptativa mediada por anticorpos e células T (LEE et al., 2020).

19 A terapia combinada já é implementada rotineiramente no tratamento de outras doenças  
20 infecciosas como a HIV/AIDS, malária e tuberculose. Tem como vantagens, poder aumentar a  
21 eficiência fungicida de fármacos normalmente fungistáticas e promover inversão de seleção de  
22 fármacos resistentes. É o que ocorre com o inibidor iKIX1 o qual tem a função de bloquear o  
23 domínio KIX dentro do complexo mediador das bombas de efluxo e impedir a regulação  
24 positiva de seus genes, fazendo com que os fármacos que antes eram expelidos para fora da  
25 célula, consigam novamente se acumular em seu interior (figura 8) (BAYM; STONE;  
26 KISHONY, 2016; SPITZER; ROBBINS; WRIGHT, 2017).

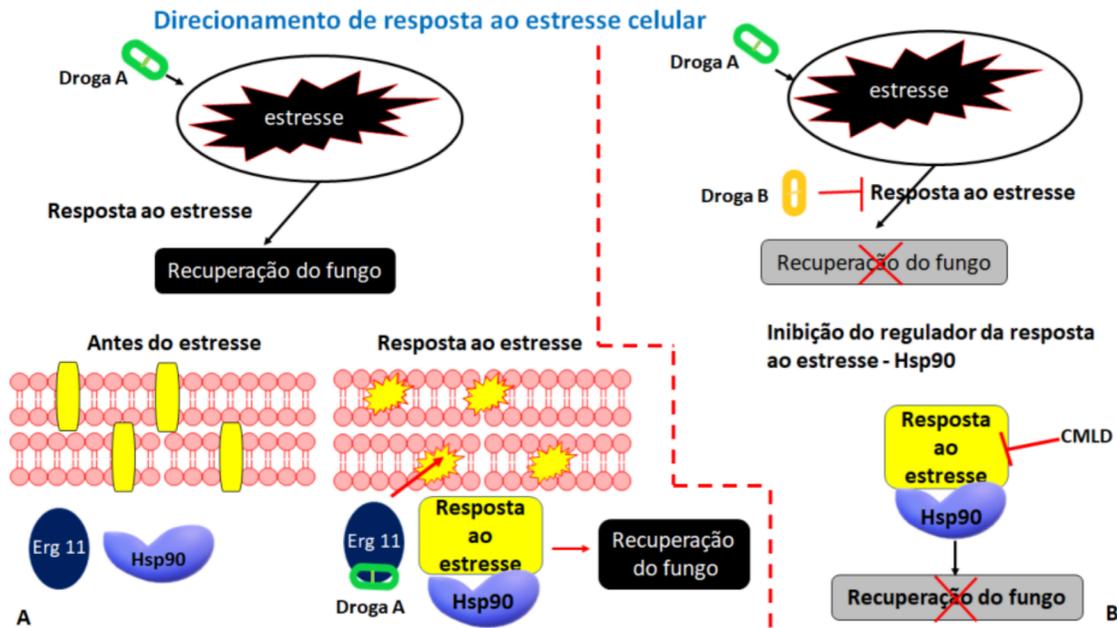


1

2 **Figura 8.** Estratégias terapêuticas de combate à resistência microbiana: Terapia combinada - aumento  
 3 da biodisponibilidade do fármaco. Adaptado de Lee, Puumala, Robbins & Cowen, 2020. A- Célula  
 4 fúngica resistente à fármaco “A”. A bomba de efluxo (azul), juntamente com seu mediador (roxo),  
 5 transportam o fármaco do citoplasma para o meio extracelular, fazendo com que ele não consiga realizar  
 6 sua função de desestabilizá-la. B- O inibidor iKIX1 sinergiza com os azóis e ressensibiliza isolados  
 7 resistentes ao fluconazol. Ele atua bloqueando o domínio KIX dentro do complexo mediador (roxo)  
 8 impedindo a regulação positiva de genes que codificam bombas de efluxo e com isso, fazendo com que  
 9 a mesmas não atuem jogando a fármaco para fora da célula.

10

11 Outra estratégia obtida a partir da terapia combinada é a inibição dos reguladores de  
 12 resposta ao estresse. O Hsp90 é um exemplo de regulador específico para *C. albicans*. Ele  
 13 regula os circuitos de resposta da célula fúngica, promovendo tolerância e resistência ao estresse  
 14 induzido por fármacos. Exemplo de inibidor de regulador é o CMLD, um derivado de produto  
 15 natural, o qual atua bloqueando as redes de sinalização no interior da célula. Essa inibição  
 16 promove bloqueio de células no estado filamentoso, prejudicando a dispersão de biofilmes e  
 17 atenuando a virulência em modelos de infecção em camundongos. (figura 9) (HUANG et al.,  
 18 2019; JUVVADI et al., 2019; WHITESELL et al., 2019).

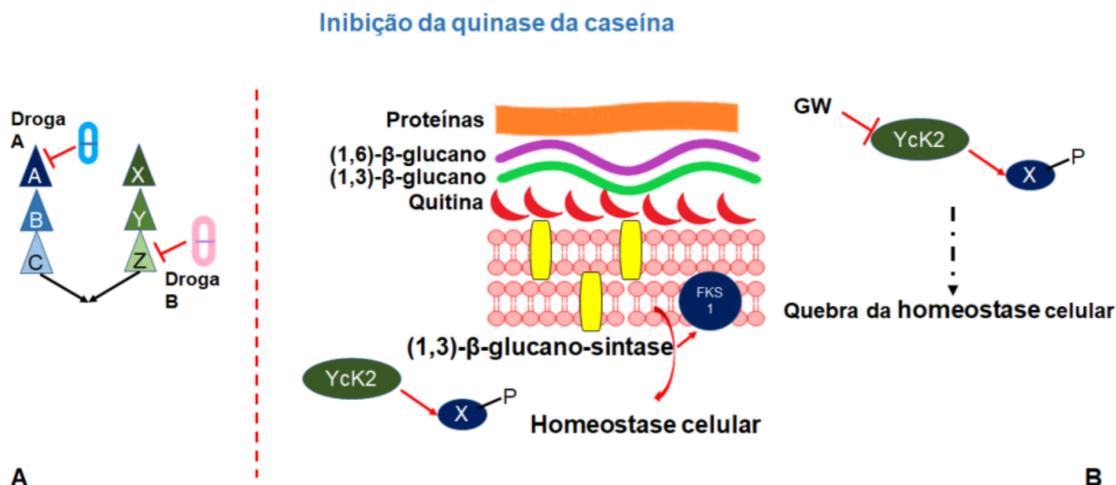


1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10

**Figura 9.** Estratégias terapêuticas de combate à resistência microbiana: Terapia combinada-direcionamento de resposta ao estresse celular. A- Resposta da célula fúngica à ação de medicamentos resistentes. As bombas de efluxo através do gene Erg11 conseguiu expulsar o fármaco do interior da célula com a colaboração da resposta ao estresse através do Hsp90. B- A fármaco “A” não conseguiu mais se expulsa do interior da célula pois sua combinação com a fármaco “B” bloqueou a resposta ao estresse fazendo com que as bombas de efluxo não atuassem com a mesma eficácia. Com isso, a fármaco “A” conseguiu permanecer no interior da célula fúngica para promover sua função que é de debelar a célula fúngica. Adaptado de Lee, Puumala, Robbins & Cowen, 2020.

11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18

Ainda dentro das opções de terapia combinada, existem opções terapêuticas que atuam em proteínas com função de manter a homeostase do microorganismo, tais como a quinase da caseína (Yck2). Esta, é um mediador importante na manutenção da integridade da parede celular. A estratégia se dá através da inibição dessa quinase através do composto 2,3-aril-pirazolopiridina (GW), fazendo com que se potencialize a eficácia das equinocandinas. Assim, teremos fármacos que visam proteínas de vias paralelas que convergem em um único processo ou função essencial exibindo atividade de potencialização e fazendo com que a célula fúngica não consiga reagir à terapia que antes era resistente (figura 10) (CAPLAN et al., 2020).



**Figura 10.** Estratégias terapêuticas de combate à resistência microbiana: Terapia combinada-inibição da quinase da caseína. A- Demonstração de vias paralelas de duas fármacos com um único objetivo. B- Exemplo dessas vias paralelas temos as equinocandinas (fármaco “A”) que atuam na enzima (1,3) -β-glucano-sintase com a finalidade de desestabilizar a síntese da parede celular e a fármaco GM (fármaco “B”), a qual também tem a mesma função, só que sua atuação é em ponto diverso de uma via paralela (quinase da caseína Yck2). Adaptado de Lee, Puumala, Robbins & Cowen, 2020.

Além dessas novas alternativas terapêuticas, outros fármacos estão sendo desenvolvidos. Fármacos que agem na biossíntese da pirimidina (F901318); que tem atuação nas enzimas do citocromo 51 (Cyp51) ao invés de atuar nas do citocromo P450, tornando o tratamento menos tóxico para seres humanos (VT-1161, VT-1129 e VT-1598); com ação frente à *Candida auris* (VT-1598, CD101 e SCY-078); aqueles que tem como alvo o 1,3-β-D-glucano, que podem oferecer vantagens sobre as equinocandinas disponíveis, pois têm sua meia-vida estendida; e os que atuam na biossíntese do glicosilfosfadidilinositol (AX001) com potente atividade antifúngica de amplo espectro (WIEDERHOLD, 2018).

### 3.3 Produtos naturais e cinamaldeído

Nos últimos 30 anos, 75% das novas entidades químicas são derivadas ou inspiradas de produtos naturais. Apesar de novas doenças fúngicas estarem sendo relatadas, apenas 0,2% dessas novas entidades são fármacos antifúngicas. Para melhorar essa proporção, atualmente estão sendo desenvolvidos dois compostos baseados em produtos naturais. Um deles é o enfumafungin, um triterpeno que levou ao produto semissintético ibrexafungerp; e o outro é a rezafungina, a qual foi desenvolvida baseada no esqueleto da equinocandinas. Ambos já se encontram na terceira fase do ensaio clínico. Vale ressaltar que os estudos de fase III são estudos comparativos e randomizados em relação ao melhor tratamento atual, com pacientes doentes (NEWMAN; CRAGG, 2020).

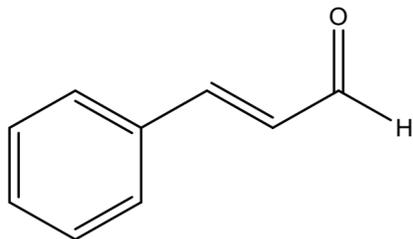
1 Os produtos naturais podem advir de fontes bacterianas, fúngicas, vegetais e animais  
2 marinhos. Quando decorrentes de bactérias, fungos e plantas são provenientes do metabolismo  
3 secundário deles. Quando decorrentes de macromoléculas naturais (DNA, RNA e proteínas) ou  
4 intermediários do metabolismo primário, não são considerados produtos naturais. Seu uso mais  
5 enfático é como agentes anti-infecciosos, notadamente antibacterinos. Como exemplos temos a  
6 eritromicina, cloranfenicol, cefalosporina, ácido clavulânico, vancomicina dentre outros. Eles  
7 possuem uma variedade tanto com relação aos seus pesos moleculares como com relação aos  
8 arranjos tridimensionais dos átomos que as compõem (KATZ; BALTZ, 2016; WRIGHT,  
9 2017).

10 A possibilidade do sequenciamento do genoma microbiano de forma menos onerosa,  
11 abriu estratégias para a descoberta de novas fármacos com base nos metabólitos secundários.  
12 Micróbios com grandes genomas codificam vários aglomerados de genes de metabólitos  
13 secundários, a maioria dos quais ainda são desconhecidos. Estudos metagenômicos indicam  
14 que existe uma grande quantidade desses novos aglomerados ainda a serem descobertos  
15 (KATZ; BALTZ, 2016; WRIGHT, 2017).

16 As plantas, por sua vez, produzem naturalmente uma variedade de metabólitos que  
17 defendem o hospedeiro da invasão microbiana. Além disso, elas possuem estruturas químicas  
18 complexas que sinteticamente seriam difíceis de serem obtidas. Com isso, os antimicrobianos  
19 naturais podem permitir a indução de diferentes mecanismos de ação em comparação com os  
20 tradicionais (DOYLE; STEPHENS, 2019). Dentre os produtos de origem vegetal, destacam-se  
21 os óleos essenciais, que são extratos líquidos de plantas aromáticas compondo uma mistura de  
22 compostos orgânicos voláteis e odoríferos (AZIZ et al., 2018; TARIQ; WANI et al., 2019). Eles  
23 possuem um amplo espectro de atividade antibacteriana, antifúngica e até antiviral, inibindo o  
24 crescimento de cepas microbianas resistentes aos fármacos disponíveis para uso clínico  
25 (TARIQ et al., 2019).

26 O óleo essencial (OE) obtido das folhas e casca de *Cinnamomum zeylanicum* Blume  
27 (canela) é um dos mais efetivos na inibição do crescimento microbiano (DOYLE; STEPHENS,  
28 2019). Encontrado na forma de um líquido oleoso amarelo com odor de canela e sabor  
29 adocicado (SIMÕES et al., 2016), tem como principais componentes o cinamaldeído, que é um  
30 fenilpropanóide derivado do ácido chiquímico (SILVA et al., 2018), eugenol, fenol e linalol.  
31 Sua casca tem um teor de eugenol baixo (5–10%) e cinamaldeído (aldeído cinâmico ou 3-fenil-  
32 2-propenal) mais alto (65–80%) (figura 11) (YANAKIEV, 2020). A literatura já demonstra que  
33 o cinamaldeído, bem como de seus derivados sintéticos, apresentam atividades: termogênica,  
34 antitumoral, função cardioprotetora, antiinflamatória, antibacteriana, antibiofilme e antifúngica

1 (DOYLE; STEPHENS, 2019). Suas características químicas fazem com que ele possa atuar  
2 como uma fármaco ativa por via oral e ser empregada como modelo para o design de novas  
3 fármacos (SHREAZ et al., 2016).



5  
6 **Figura 11.** Estrutura química do cinamaldeído.

7 A ação anti-inflamatória do cinamaldeído se dá através da indução de apoptose, inibição  
8 da proliferação celular nas respostas imunes mediadas por monócitos/macrófagos, da supressão  
9 da produção de óxido nítrico, diminuição dos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-6 (MATEEN et al., 2019;  
10 SILVA; FIGUEIREDO; DE OLIVEIRA et al., 2018), regulação positiva dos níveis superficiais  
11 de moléculas co-estimulatórias (CD80 e CD69) e dos receptores de reconhecimento de padrões  
12 (receptor toll-like 2 (TLR2) e receptor de complemento (CR3) (SILVA et al., 2018).

13 Um dos possíveis efeitos indesejáveis do cinamaldeído é a hipersensibilidade. A  
14 literatura já apresenta casos de reações alérgicas intraorais após o uso de produtos que  
15 continham cinamaldeído (ISAAC-RENTON; LI; PARSONS, 2015). Contudo, relatos de  
16 dermatite de contato alérgica e estomatite como resultado do uso do OE de canela são raros  
17 (YANAKIEV, 2020). Estudo *in vivo* relatou ausência de efeitos adversos significativos no  
18 fígado, nenhuma hipersensibilidade e uma ampla faixa terapêutica de *C. zeylanicum*  
19 (YANAKIEV, 2020).

20 A literatura já havia demonstrado na análise de acoplamento molecular, a interação e  
21 afinidade do cinamaldeído com os alvos fúngicos, e, mais fortemente, pelos alvos relacionados  
22 à complexação do ergosterol, como o PDBID-4MAI (enzima esqualeno epoxidase), cuja  
23 energia de ligação com o cinamaldeído foi -70,49 (ALVES et al., 2020). Nesse estudo também  
24 foi comprovado através da análise *in vitro*, sua atividade fungicida forte (ALVES et al., 2021),  
25 cujos valores variaram de 18,9 $\mu$ M a 37,83 $\mu$ M, com provável mecanismo de ação via membrana,  
26 além de mostrar que ocorreu viabilidade celular de queratinócitos expostos ao cinamaldeído até  
27 a concentração de 946 $\mu$ M (ALVES et al., 2020).

28 Ainda na análise *in vitro*, o cinamaldeído foi testado incorporado a um reembasador de  
29 prótese como forma de prevenir a recorrência de infecções fúngicas na cavidade oral decorrente  
30 do uso de prótese. Tal estudo comprovou a capacidade do cinamaldeído em inibir a formação

1 de biofilme de *Candida* além de não alterar o padrão de dureza do material no qual o  
2 cinamaldeído foi incorporado, sendo, portanto, útil para a prática clínica (MAIOR et al., 2019).  
3 Outro estudo investigou a eficácia do cinamaldeído na desinfecção de próteses totais removíveis  
4 e o efeito nas propriedades físicas e mecânicas da resina acrílica da prótese. Ele comprovou que  
5 o cinamaldeído foi eficaz contra todos os microrganismos avaliados, causando pequenas  
6 alterações nos parâmetros de dureza, rugosidade superficial e cor, sem relevância clínica (DE  
7 ALMEIDA et al., 2020).

8 O cinamaldeído foi testado para uso tópico em modelo *in vivo* para o tratamento de  
9 feridas de pele decorrentes de infecções por *Pseudomonas aeruginosa* (FERRO et al., 2019),  
10 bem como na forma de pomada para ser testada em cicatrizações de feridas em camundongos  
11 diabéticos (DAEMI et al., 2019). Também foi comprovada, através de um ensaio clínico fase  
12 II, a eficácia de um enxaguatório bucal contendo OE de *Cinnamomum zeylanicum* Blume,  
13 produto que tem o cinamaldeído como um dos componentes majoritários, no tratamento da  
14 candidíase oral (DE ARAÚJO et al., 2021). Contudo, o seu uso na forma de pomada em orabase  
15 para uso tópico no tratamento de infecções fúngicas que acometem a cavidade oral, ainda não  
16 foi testada. Para se chegar no ensaio clínico com segurança, é necessário definir a segurança e  
17 toxicidade do cinamaldeído em modelos *in vivo* com a finalidade de propor uma forma  
18 farmacêutica segura contendo cinamaldeído em sua composição.

### 19 **3.4 Modelos para estudos da toxicologia/farmacologia de fármacos com potencial** 20 **antifúngico**

21 O uso de animais experimentais em farmacologia e toxicologia remonta ao século  
22 passado. Os testes iniciais foram de toxicidade aguda para prevenir intoxicações e permitir a  
23 classificação dos produtos químicos, mas atualmente, o foco mudou para toxicidade de longo  
24 prazo, tais como carcinogenicidade, toxicidade reprodutiva, neurotoxicidade e imunotoxicidade  
25 (KNUDSEN et al., 2019). A toxicologia investigativa descreve a caracterização de riscos e a  
26 elucidação de toxicidades, apoiando as primeiras decisões de segurança com o objetivo de  
27 melhorar as decisões pré-clínicas (BEILMANN et al., 2019).

28 Uma maior consciência ética implica em um controle mais rigoroso da utilização de  
29 vertebrados para estudos *in vivo*. Para lidar com esse novo cenário, inúmeras alternativas aos  
30 roedores foram propostas. Dentre essas, a larva da *Galleria mellonella* (*G. mellonella*) teve  
31 papel preponderante, principalmente no campo microbiológico, conforme demonstrado pelo  
32 crescente número de publicações científicas recentes (CUTULI et al., 2019). Este modelo, além  
33 de viável, por ser um modelo de baixo custo e validado (DE ALMEIDA ROCHELLE et al.,

1 2016; FREIRES et al., 2017), fornece respostas em curto período, pois as larvas apresentam  
2 ciclo de vida curto (aproximadamente 6 semanas) e não há necessidade de se utilizar  
3 equipamentos especializados. O principal fator chave que torna *G. mellonella* um modelo não  
4 clínico útil *in vivo* é sua resposta imune inata que compartilha várias estratégias com o sistema  
5 imune inato dos mamíferos (CUTULI et al., 2019; IGNASIAK; MAXWELL, 2017). Além  
6 disso, apesar das grandes diferenças evolutivas entre insetos e mamíferos, os resultados obtidos  
7 por essas larvas são comparáveis aos obtidos com camundongos (CUTULI et al., 2019).

8 Os modelos celulares *in vitro* tornaram-se mais populares para a avaliação da toxicidade;  
9 esses modelos incluem células-tronco embrionárias de camundongo, embriões de rato e  
10 embriões de peixe-zebra (*Danio rerio*). Destes modelos, o ensaio com peixes-zebra é o mais  
11 passível de abordagens de alto rendimento e alto conteúdo (LI; XIA, 2019). O estudo com este  
12 modelo de vertebrado tem se mostrado útil para toxicologia, especialmente na triagem de  
13 fármacos e estudos de doenças humanas (GAMSE; GORELICK, 2016).

14 *Danio rerio* é um peixe teleosteo tropical já estabelecido como modelo animal na  
15 pesquisa biomédica. Seu uso oferece vantagens práticas e econômicas, por ser um animal de  
16 baixo custo de manutenção e alta fecundidade, conferindo potencial aplicação em técnicas de  
17 médio e alto desempenho, como varredura de novos fármacos e tóxicos (KOENIG; DAO; KAN  
18 et al., 2016). Além disso, seu curto ciclo de vida permite que os embriões atinjam o estado  
19 larval dentro de 48-72 horas após a fertilização (hpf) e se tornem sexualmente maduros quando  
20 atingem cerca de 10-12 semanas de vida, o que facilita estudos crônicos ou envolvendo mais  
21 de uma geração (MEYERS, 2018).

22 Atualmente, tem-se dado preferência ao uso de embriões e larvas em relação ao peixe-  
23 zebra adulto, seja por razões éticas, econômicas ou biológicas. O rápido desenvolvimento  
24 embrionário, o tamanho da larva e a alta disponibilidade de indivíduos permitem que estudos  
25 de alto desempenho rastreiem a toxicidade em um organismo inteiro, fornecendo uma visão  
26 mais panorâmica dos efeitos tóxicos do que seria possível apenas em culturas de células. Além  
27 disso, os embriões são translúcidos e se desenvolvem fora do organismo materno, permitindo  
28 que alterações morfológicas sejam observadas desde as primeiras horas após a fecundação  
29 (BAMBINO et al., 2016). Nesse contexto, esses embriões se destacam como um modelo de  
30 sistema vertebrado altamente eficaz em estudos de toxicidade. Além das vantagens inerentes às  
31 suas características morfológicas, uma alta similaridade do seu genoma com o genoma humano  
32 confere uma conservação especial dos processos envolvidos nas respostas tóxicas (HOWE et  
33 al., 2013).

1           Dentre os métodos para investigação de toxicidade genética *in vivo*, o teste do  
2 micronúcleo, realizado em roedores, tem sido amplamente empregado e aceito pelas agências  
3 reguladoras e comunidade científica (ANVISA, 2013). Este ensaio é um importante teste de  
4 avaliação da genotoxicidade de substâncias, com a finalidade de classificá-las como agentes  
5 mutagênicos/carcinogênicos, através da observação da formação de micronúcleos (TOBÓLSKA et  
6 al., 2018). Estes, são pequenas cromatinas contendo um corpo arredondado visível no  
7 citoplasma das células. É formado por dano ao DNA ou instabilidade genômica, como resultado  
8 de processos naturais, como metabolismo ou envelhecimento, ou por indução de fatores  
9 ambientais e diferentes doenças. Os micronúcleos podem se originar de fragmentos de  
10 cromossomos acêntricos resultantes de quebras de fitas de DNA mal reparadas; malsegregação  
11 de cromossomos, que faz com que o cromossomo inteiro fique para trás durante a mitose e  
12 envelhecimento da mulher, quando alguns cromossomos X são excluídos do núcleo;  
13 instabilidade cromossômica que é freqüentemente exibida por células pré-neoplásicas e  
14 cancerosas (SOMMER; BURACZEWSKA; KRUSZEWSKI, 2020).

15           Estudo clínico é um estudo de pesquisa envolvendo voluntários humanos (também  
16 chamado de participantes) que tem o objetivo de aumentar o conhecimento sobre eficácia de  
17 tratamentos, sejam medicamentosos ou não. Se classifica em estudos de intervenção (também  
18 chamados de ensaios clínicos) e estudos observacionais. Aqueles se dividem em quatro fases:  
19 Fase 1 é a fase cujo enfoque é a segurança de um medicamento. Geralmente são realizados com  
20 voluntários saudáveis e tem o objetivo de determinar os eventos adversos mais frequentes e  
21 como o medicamento é decomposto e excretado pelo corpo. Esses ensaios geralmente envolvem  
22 um pequeno número de participantes; Fase 2 é a fase que reúne dados preliminares se um  
23 medicamento funciona em pessoa que têm uma determinada condição/doença, ou seja, avalia a  
24 eficácia do medicamento. Contudo, contudo a segurança e os eventos adversos estudados na  
25 fase anterior continuam sendo avaliados; A fase 3 reúne mais informações sobre segurança e  
26 eficácia de um medicamento em diferentes populações e dosagens. Esta fase envolve um  
27 número maior de participantes; já a fase 4 ocorre depois que a agência reguladora aprova o  
28 medicamento para a comercialização. Nessa fase são coletadas informações adicionais sobre a  
29 segurança, eficácia ou uso ideal do medicamento (FRIEDMAN et al., 2015).

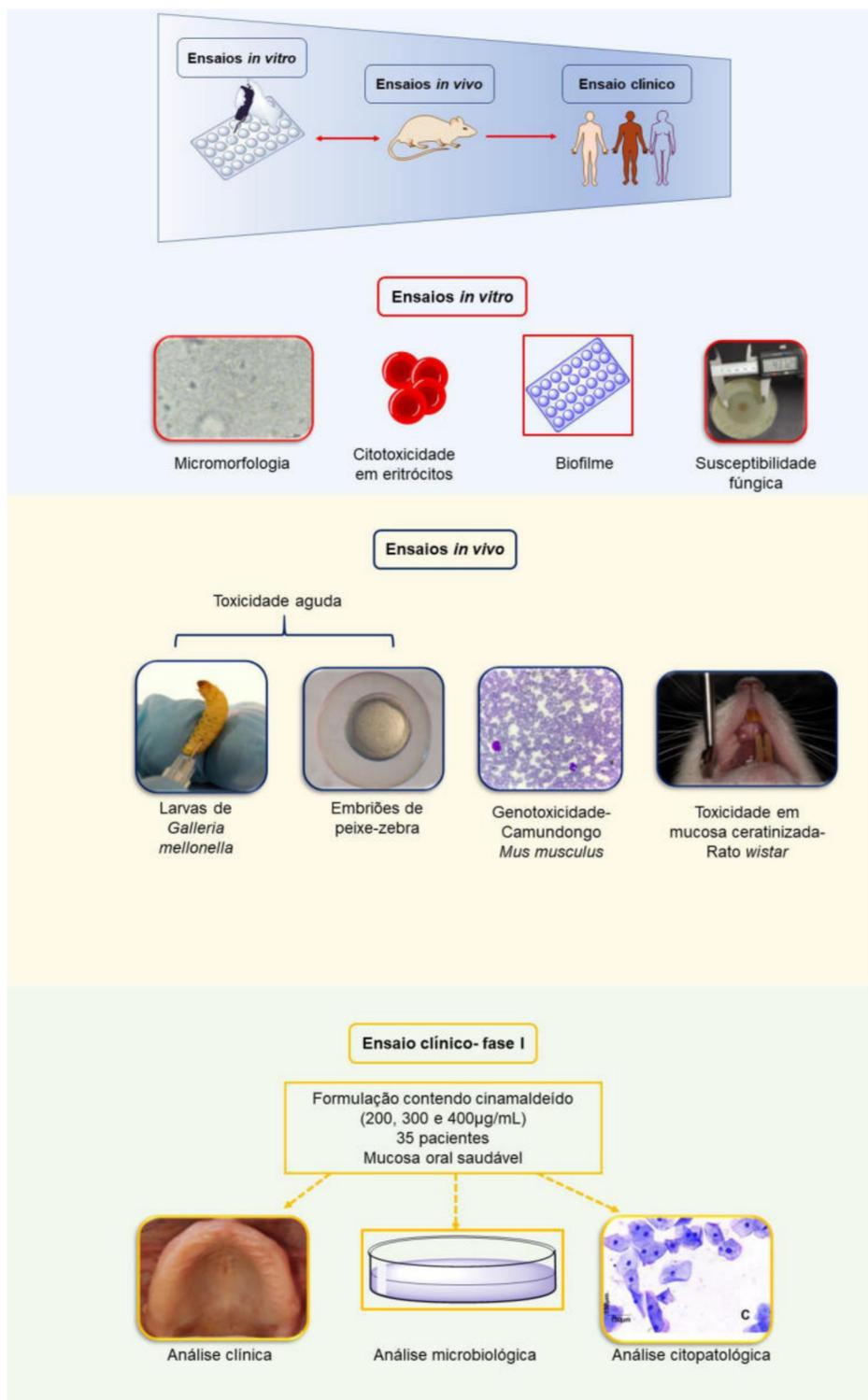
30

## *Materiais e métodos*

# 1 4 MATERIAL E MÉTODOS

## 2 4.1 Etapas gerais do estudo

3 A figura 12 aborda uma visão geral de todas as etapas executadas neste estudo.



4

5 **Figura 12.** Etapas gerais do estudo.

## 1 4.2 Locais da pesquisa

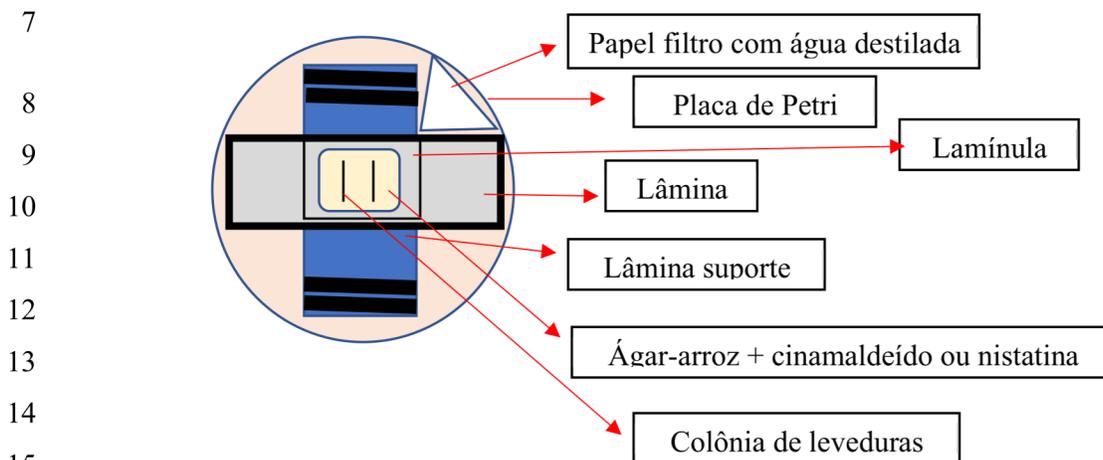
- 2  Os experimentos *in vitro*: Laboratório de Farmacologia experimental e Cultivo Celular  
3 (LAFECC) – Coordenação: Prof<sup>o</sup>. Ricardo Castro; Programa de Pós-graduação em  
4 Odontologia (PPGO) - (CCS-UFPB);
- 5  Análises histopatológicas: Laboratório de Imunopatologia Experimental (LABIPEX)  
6 sob colaboração de professor Adriano Francisco Alves- Programa de Pós-graduação em  
7 Odontologia (PPGO) - (CCS-UFPB);
- 8  Testes de segurança em ratos e genotoxicidade: Biotério Prof<sup>o</sup>. Thomas George, do  
9 Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) - Programa de Pós-  
10 graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB)- (CCS-UFPB);
- 11  Experimentos envolvendo embriões de peixe-zebra: Laboratório de Avaliação de Risco  
12 de Novas Tecnologias (LabRisco) localizado no Departamento de Biologia Molecular  
13 do Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN), em colaboração com o Prof. Dr.  
14 Davi Felipe Farias;
- 15  Experimentos envolvendo larvas de *Galleria mellonella*: Programa de Pós-graduação  
16 em Odontologia de Piracicaba (UNICAMP), sob colaboração de professor Pedro  
17 Rosalen;
- 18  Ensaio clínico: Setor de triagem do curso de graduação em Odontologia/CCS/UFPB.

## 19 4.3 Ensaios *in vitro*

20 4.3.1 Estudo do efeito do cinamaldeído sobre a micromorfologia de cepas de *C. albicans* ATCC  
21 90028 e *C. krusei* ATCC 6258

22 Os efeitos do cinamaldeído (Sigma-Aldrich<sup>®</sup> Chemical Co. -St. Louis, MO, EUA)  
23 contra pseudo-hifas, clamisdóporos e blastocônia de *C. albicans* ATCC 90028 e *C. krusei*  
24 ATCC 6258, obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD, EUA),  
25 foram avaliados por ensaio de microcultura usando ágar de arroz derretido (CA, HiMedia  
26 Laboratories, Mumbia, Índia) com Tween 80 (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) (ALVES et al., 2013;  
27 FERREIRA et al., 2017) . O cinamaldeído e nistatina foram adicionados ao meio de cultura  
28 (1mL de ágar-arroz) antes da solidificação na concentração correspondente a Concentração  
29 Inibitória Mínima (CIM). Estudo prévio definiu os valores das CIM do cinamaldeído e nistatina  
30 para as duas cepas testadas: cinamaldeído: 37,8 µM para a cepa de *C. albicans* ATCC 90028 e  
31 18,91µM para *C. krusei* ATCC 6258; nistatina: 34,67 µM para a cepa de *C. albicans* ATCC  
32 90028 e 17,33 µM para *C. krusei* ATCC 6258 (ALVES et al., 2020). Após solidificação do meio,  
33 semeou-se a levedura, com auxílio de uma alça microbiológica, fazendo 02 estrias paralelas. As

1 estrias foram cobertas com lamínulas esterilizadas. Para evitar ressecamento do meio, fez-se uma  
 2 câmara úmida (figura 13), acrescentando 2 mL de água destilada sobre um pedaço de papel de filtro  
 3 estéril na placa, durante o período de incubação a 35°C. A placa foi fechada e após 24h as lâminas  
 4 foram examinadas em microscopia de luz (Nikon Eclipse Ci®) com aumento de 400x para  
 5 determinar a formação ou ausência de estruturas características das cepas de *C. krusei* e *C.*  
 6 *albicans*. Foram preparadas três placas para cada cepa em três repetições.



16 **Figura 13.** Desenho esquemático da câmara úmida utilizada no teste de micromorfologia.

17 4.3.2 Estudo do efeito do cinamaldeído sobre a redução do biofilme de cepas do gênero *Candida*  
 18 spp.

19 Os efeitos de diferentes concentrações de cinamaldeído (Sigma-Aldrich® Chemical Co.  
 20 -St. Louis, MO, EUA) na redução do biofilme de espécies mistas (*C. albicans* ATCC 90028,  
 21 *C. albicans* CBS 562, *C. krusei* CBS 573 e *C. tropicalis* CBS 94) foram determinados de acordo  
 22 com um protocolo de microdiluição adaptado (DE ALMEIDA FREIRES et al., 2014). Foram  
 23 adicionados aos poços 100 µL de inóculo de levedura (25 µL de cada cepa a  $2,5 \times 10^6$  UFC/mL)  
 24 preparado com Caldo Sabouraud Dextrose com adição de sacarose (2%). Após 48h, foram  
 25 adicionados 100 µL de solução de cinamaldeído (variando de 151,3 - 378,3 µM). A Nistatina  
 26 (Sigma-Aldrich® Chemical Co. -St. Louis, MO, EUA) foi usada como controle (variando 21,6  
 27 a 54 µM). A esterilidade do meio e os controles de crescimento não tratados também foram  
 28 incluídos em todos os ensaios. As placas foram incubadas a 35 °C durante 48 h. O biofilme foi  
 29 quantificado usando 0,4% de violeta de cristal (p/v), seguido de dissolução em etanol a 95%. A  
 30 densidade óptica de etanol a 95% foi medida a 595nm (Multiskan GO; Thermo Fisher  
 31 Scientific). A inibição da adesão foi medida indiretamente considerando o grupo de crescimento  
 32 de levedura como 100% de adesão do fungo (ELLEPOLA et al., 2017). O ensaio foi realizado  
 33 em triplicata em três experimentos independentes.

### 4.3.3 Citotoxicidade em eritrócitos humanos

A atividade hemolítica do cinamaldeído foi determinada utilizando glóbulos vermelhos humanos (tipos O<sup>+</sup>, B<sup>+</sup>, A<sup>-</sup> e AB<sup>+</sup>) de acordo com o método proposto por Jain e colaboradores (JAIN et al., 2015). A coleta de amostras de sangue periférico humano (cerca de 10 mL) foi feita por punção de voluntários adultos e saudáveis, n = 4, utilizando material estéril adquirido comercialmente (agulhas e seringas BD Plastipak® – BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) e colhidos em tubos a vácuo (Greiner bione, Vacuette, Americana, SP, Brasil) contendo solução anticoagulante. Após a coleta, os eritrócitos foram diluídos em 80 µL de PBS, ajustando a concentração do sangue para 5% de hemácias. Em seguida foi adicionado nos eppendorfs, cinamaldeído, em triplicata, nas três repetições, nas concentrações seriadas de 37,83 – 1210,6 µM, diluído num volume de 20 µL de PBS. Logo após, foi incubado em 37 °C por 1 h e a reação de hemólise foi interrompida pela adição de 200 µL de solução salina tamponada com fosfato (PBS; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM, NaCl 136,9 mM e KCl 2,6 mM, pH 7,2). As suspensões foram centrifugadas a 1000G, por 10 min, a temperatura ambiente, com o objetivo de coletar e transferir o sobrenadante para placas 96 poços e mensurar a porcentagem de hemólise em leitora de microplaca no comprimento de onda de 550nm. A porcentagem de hemólise foi determinada como  $[(Abs_{am} - Abs_{con}) / (Abs_{tot} - Abs_{con}) \times 100]$ , onde Abs<sub>am</sub> foi a absorbância das amostras, Abs<sub>con</sub> correspondeu à absorbância do controle em branco (PBS + 0,5% de Tween80) e Abs<sub>tot</sub> foi a absorbância de hemólise total (substituindo a solução de amostra por um volume igual de água Milli-Q).

Os voluntários do estudo autorizaram sua participação assinando um termo de consentimento livre e esclarecido. O estudo foi conduzido de acordo com a Declaração de Helsinque e o protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal da Paraíba sob o protocolo nº. 3.430.215 (aprovado em 2 de julho de 2019) (ANEXO 1).

### 4.3.4 Teste de susceptibilidade fúngica

Para esta análise, foi utilizada a cepa padronizada de *Candida albicans* (ATCC) 90028. Foi realizado teste de difusão em ágar por intermédio da técnica de perfuração de poços. O inóculo fúngico foi ajustado e padronizado para a concentração de  $2,0 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>. O cinamaldeído foi testado na forma de pomada em orabase, a qual está em processo de análise do depósito da patente no Instituto Nacional da Propriedade Industrial-INPI, sob número BR 10 2019 025510 2 (ANEXO 2). As concentrações testadas foram (12,5; 25; 50; 100; 200; 300; 400; 500; 600; 700 e 800µg/mL).

1           As placas de Petri contendo ágar foram preparadas de forma homogênea para todos os  
2 grupos. Cada placa recebeu um total de 24 mL de ágar Sabouraud Dextrose (ASD, São José do  
3 Pinhais – PR, Brasil). Com auxílio de uma alça de inoculação, foram colhidas algumas colônias  
4 fúngicas desta cepa, suspensas em 5 mL de Caldo Sabouraud Dextrose (CSD) e colocado  
5 numa estufa a 35 °C. Após 24h, o inóculo foi ajustado e introduzido um swab estéril para ser  
6 inoculado em forma de estrias na superfície do ágar em três direções. As placas previamente  
7 inoculadas tiveram removidas pequenas porções do meio de cultura sólido para a formação dos  
8 poços, com o auxílio da borda superior de um tubo de ensaio. Cerca de 90mg da pomada orobase  
9 contendo cinamaldeído foi colocada dentro de um orifício central feito no ágar. Decorrido o  
10 período de incubação, os diâmetros dos halos de inibição do desenvolvimento fúngico foram  
11 mensurados com um paquímetro. Os ensaios foram realizados em triplicata. Miconazol gel (20  
12 mg/g) (Janssen-Cilag Farmacêutica Ltda, São Paulo-SP, Brasil) foi utilizado como controle  
13 positivo (OSTROSKY et al., 2008).

#### 14 **4.4 Ensaios *in vivo***

##### 15 4.4.1 Animais e comitê de ética

16           As larvas de *G. mellonella* foram gentilmente fornecidas por L. G. Leite do Instituto  
17 Biológico, Departamento de Agricultura e Abastecimento (Campinas, São Paulo, Brasil). As  
18 larvas foram mantidas a 37°C em uma incubadora BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio)  
19 até o uso. Os experimentos foram conduzidos no laboratório da FOP/UNICAMP.

20           Os embriões de peixe-zebra (*Danio rerio*) foram fornecidos pelo Departamento de  
21 Biologia Molecular da Universidade Federal da Paraíba (João Pessoa, Brasil). Peixe-zebra  
22 adultos (cepa selvagem) foram mantidos a  $26 \pm 1$  °C sob fotoperíodo de 14:10 h (claro: escuro).  
23 A qualidade da água foi mantida por filtração com carvão ativado, condutividade em  $750 \pm 50$   
24  $\mu$ S e oxigênio dissolvido acima de 95% de saturação. Os peixes foram alimentados diariamente  
25 com ração comercial (Tetra ColorBits, Sarandi, Brasil) e *Artemia* sp. nauplii, sendo também  
26 monitorado para comportamento anormal ou desenvolvimento de doença. Para obter os  
27 embriões, uma armadilha de ovos desse peixe foi colocada durante a noite em um tanque  
28 contendo espécimes masculinos e femininos (proporção de 2: 1) um dia antes do teste. Uma  
29 hora após o início do ciclo de luz, os ovos foram coletados com uma pipeta Pasteur e  
30 enxaguados com meio E3 (NaCl 5 mM, KCl 0,17 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,33 mM e MgSO<sub>4</sub> 0,33 mM)  
31 para a seleção subsequente de embriões usando um estereomicroscópio (ampliação de 80x). Os  
32 ovos fertilizados viáveis foram selecionados para ensaios de toxicidade embrionária (LISBOA  
33 et al., 2020).

1 Para o teste de genotoxicidade foram utilizados camundongos machos, suíços albinos  
2 (*Mus musculus*), com cinco a seis semanas de idade, pesando aproximadamente 30 g.

3 A avaliação da toxicidade em mucosa oral ceratinizada foi realizada em ratos fornecidos  
4 pela Unidade de Produção Animal do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos  
5 (IPEFarM), da Universidade Federal da Paraíba. Foram utilizados ratos heterogênicos da  
6 espécie *Rattus Norvegicus*, raça *Wistar*, pesando em média 300g.

7 Todos estes estudos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais em  
8 Pesquisa (CEUA) da Universidade Federal da Paraíba, número de aprovação 2342111119  
9 (ANEXO 3).

#### 10 4.4.2 Toxicidade aguda usando larvas de *Galleria mellonella*

11 Com o objetivo de definir se o perfil de toxicidade do cinamaldeído é dose dependente  
12 frente à sobrevivência das larvas da *Galleria mellonella*, foi testada a hipótese de que essa  
13 substância não é tóxica nesse modelo animal invertebrado. Oito doses de cinamaldeído (0,15;  
14 0,31; 0,62; 1,25; 2,5; 5; 10 e 20 mg/Kg) foram testadas em larvas pesando 200 a 300 mg sem  
15 sinais de melanização e selecionadas aleatoriamente para cada grupo (n = 15/grupo). O  
16 cinamaldeído (grupo-teste) ou NaCl 0,9% (grupo-controle) foram injetados (10µL) na  
17 hemocele de cada larva através do último proleg esquerdo usando uma seringa de 25µL de  
18 Hamilton (Hamilton, Reno, NV). O veículo utilizado para diluir a substância (dimetilsulfóxido)  
19 também foi testado quanto a sua letalidade. Todos os grupos foram incubados a 30°C e a  
20 sobrevivência das larvas foi monitorada em intervalos selecionados por até 72 h. Larvas com  
21 ausência de movimentos ao toque foram consideradas mortas (DE ALMEIDA ROCHELLE et  
22 al., 2016; SARDI et al., 2017).

#### 23 4.4.2 Toxicidade aguda usando embriões de peixe-zebra

24 O teste de Toxicidade Aguda de Embriões de Peixe (TEP) com cinamaldeído foi  
25 conduzido de acordo com a diretriz número 236 da OCDE (OECD, 2013). Embriões de peixe-  
26 zebra com até 3 hpf (horas pós-fertilização) de idade foram expostos a seis concentrações  
27 crescentes de cinamaldeído (0,56; 0,28; 0,14; 0,07; 0,035; 0,017 µg / L). Para cada concentração  
28 testada foi preparada uma placa de 24 poços contendo 20 ovos fertilizados (1 embrião por poço)  
29 expostos à amostra teste e 4 embriões expostos apenas ao meio E3 (controles internos). Uma  
30 placa adicional contendo embriões expostos ao meio E3 também foi testada. A exposição foi  
31 realizada por 96 horas, e os embriões foram analisados a cada 24 horas para avaliar as seguintes  
32 alterações: coagulação do ovo; falta de formação de somito; falta de desprendimento do botão

1 da cauda do saco vitelino e falta de batimento cardíaco. Além disso, os efeitos subletais também  
2 foram registrados diariamente, tais como: malformação ocular; malformação dos otólitos;  
3 malformação de boca; malformação da coluna; pigmentação corporal; atraso na incubação dos  
4 ovos; atraso de desenvolvimento; edema do saco vitelino; malformação corporal; edema  
5 pericárdico; edema de cabeça e coagulação sanguínea. O número de mortes (desfechos letais)  
6 e os efeitos subletais foram usados para calcular o LC<sub>50</sub> (concentração letal mediana) e EC<sub>50</sub>  
7 (concentração efetiva mediana), respectivamente, por análise de regressão probit (FINNEY,  
8 1971).

9 As exposições ocorreram em condições estáticas (sem renovação da amostra de teste ou  
10 meio E3). As observações foram realizadas em estereomicroscópio (aumento 80x) e  
11 fotografadas (Zeiss). Após 96 h, as larvas sobreviventes foram sacrificadas com eugenol e  
12 devidamente descartadas.

#### 13 4.4.3 Genotoxicidade

14 Para a avaliação da genotoxicidade da amostra foi realizado o ensaio do micronúcleo  
15 em sangue periférico de camundongos. Grupos de cinco camundongos (n=5/grupo) machos,  
16 suíços albinos (*Mus musculus*), com cinco a seis semanas de idade, pesando aproximadamente  
17 30 g, receberam, por gavagem, a dose referente à concentração de 1200 µg/mL (4 mg/Kg). Um  
18 grupo controle negativo (solução de 0.9% NaCl e Tween 80 à 2%) e o outro grupo controle  
19 positivo (ciclofosfamida, 50 mg/Kg) foram incluídos. Após 48 horas dos tratamentos, os  
20 animais foram submetidos a uma pequena incisão na cauda e obtenção de uma amostra de  
21 sangue (10 µL) para confecções das extensões sanguíneas. Após secagem, as lâminas foram  
22 coradas com coloração panótica (Panótico Rápido®) para posterior análise em microscópio  
23 óptico. Para cada animal, três extensões sanguíneas foram preparadas e um mínimo de 2000  
24 eritrócitos contados por animal para determinação do número de eritrócitos micronucleados.  
25 Após os ensaios *in vivo* de genotoxicidade, os animais foram anestesiados com uma solução de  
26 xilazina (16 mg/kg – i.p.) e cetamina (100 mg/kg – i.p.) e, em seguida, eutanasiados por  
27 deslocamento cervical (OECD, 1997). O procedimento experimental foi aprovado pela  
28 Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba sob número de  
29 protocolo 2342111119.

#### 30 4.4.4 Estudo de toxicidade em mucosa oral ceratinizada de ratos

31 Cinquenta ratos heterogênicos da espécie *Rattus Norvegicus*, raça Wistar, pesando em  
32 média 300 g, foram obtidos da Unidade de Produção Animal do Instituto de Pesquisa em

1 FÁRMACOS e Medicamentos (IPEFARM), da Universidade Federal da Paraíba e divididos  
2 aleatoriamente em 10 grupos (5 ratos/grupo) para as diferentes concentrações de uma pomada  
3 antifúngica (25 µg/mL, 50 µg/mL, 100µg/mL 200µg/mL, 300µg/mL, 400µg/mL, 500µg/mL,  
4 600µg/mL e 700µg/mL), além do controle negativo com a base da pomada sem o princípio  
5 ativo. Números aleatórios foram gerados usando a função “aleatório entre” no Microsoft Excel  
6 para a escolha dos animais em seus respectivos grupos. Os animais foram mantidos em gaiolas  
7 plásticas e mantidos em uma sala com controle ambiental (temperatura 24 °C, umidade relativa  
8 60% e ciclo claro / escuro de 12 horas) com livre acesso a ração pellet sólida fresca e água.

9 Foram feitas três aplicações em intervalos de 8 horas (113 mg de pomada, em média)  
10 durante 15 dias, simulando o tratamento para infecções fúngicas orais causadas por *Candida*  
11 spp. (LOMBARDI; OUANOUNOU, 2020). Os animais foram cuidadosamente manuseados e  
12 monitorados para evitar possíveis riscos de acidentes, intoxicações e/ou contaminações. A  
13 aplicação foi realizada com bastante delicadeza para que não machucasse a mucosa palatal do  
14 rato. Para evitar uma possível toxicidade nos ratos, cada concentração só foi aumentada quando  
15 o grupo em teste não sofresse nenhuma reação indesejada, tais como perda abrupta de peso,  
16 inflamação e/ou ulceração da mucosa. Ou seja, se alguma concentração a pomada orobase  
17 contendo cinamaldeído provocasse efeitos indesejáveis, a concentração maior subsequente não  
18 seria testada. Em caso de sofrimento não tratável, os animais seriam submetidos à eutanásia  
19 imediata.

20 Todos os animais após período de uso da pomada foram submetidos à análise histológica  
21 a partir da realização de biópsia excisional da mucosa do palato duro. Os tecidos obtidos foram  
22 fixados em formol tamponado a 10% (pH 7,4) por 72 horas. Os cortes histológicos, com 4µm  
23 de espessura, foram colocados em lâminas de vidro e corados pelas técnicas de Hematoxilina  
24 e Eosina para posterior avaliação dos eventos histológicos ocorridos em cada um dos grupos  
25 através de microscopia de luz. Todos os procedimentos desde o início do estudo até o momento  
26 de eutanásia foram realizados para evitar o sofrimento, reduzir o desconforto e dor dos animais  
27 (CONCEA, 2015).

28 A classificação dos eventos histológicos se deu de acordo com a presença de células  
29 inflamatórias, alteração da população das células residentes do tecido conjuntivo,  
30 características da substância intercelular amorfa e da substância intercelular fibrosa. O material  
31 foi classificado por um único examinador e os eventos histológicos observados na região da  
32 mucosa para cada grupo experimental foram descritos após realização do tratamento.

## 1 **4.5 Ensaio clínico fase I**

### 2 4.5.1 Considerações Éticas e Registro Primário do Ensaio:

3 Todos os procedimentos realizados levaram em consideração os padrões éticos da  
4 Declaração de Helsinque, 1964. O estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)  
5 do Centro de Ciências da saúde da Universidade Federal da Paraíba, sendo aprovado com o  
6 número de parecer 3.892.294. A fim de que o estudo fosse conduzido dentro dos padrões éticos  
7 que regem a pesquisa em seres humanos, todos os esclarecimentos sobre a importância da  
8 pesquisa foram oferecidos aos participantes. Foi feito o registro do ensaio clínico na plataforma  
9 de Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos, sob identificação U1111-1235-0399 (RBR-7zwzs3,  
10 ensaiosclínicos.gov.br).

### 11 4.5.2 Desenho do estudo

12 Esse estudo se classificou como ensaio clínico de fase I. Caracterizou-se como um  
13 estudo prospectivo, de natureza quantitativa, comparativo, de campo e intervencionista. A  
14 análise dos dados da fase I ocorreu a partir da observação direta intensiva (a partir dos aspectos  
15 clínicos manifestados na cavidade oral) bem como extensiva (a partir da análise de resultados  
16 referentes a exames micológicos e citopatológicos dos sujeitos participantes, em laboratório).

### 17 4.5.3 Participantes

18 Os critérios de elegibilidade foram: indivíduos saudáveis; maiores de 18 anos; usuários  
19 de próteses removíveis superior; que não estivessem em tratamento com antimicrobianos  
20 tópicos e/ou sistêmicos, fossem capazes de dar o próprio consentimento em detrimento das  
21 razões psiquiátricas e/ou mentais e mulheres que não estivessem gestantes ou puérperas. Já os  
22 critérios de exclusão foram: pacientes com histórico de reações alérgicas aos componentes do  
23 produto, que desistissem ao longo do ensaio ou usassem incorretamente a pomada.

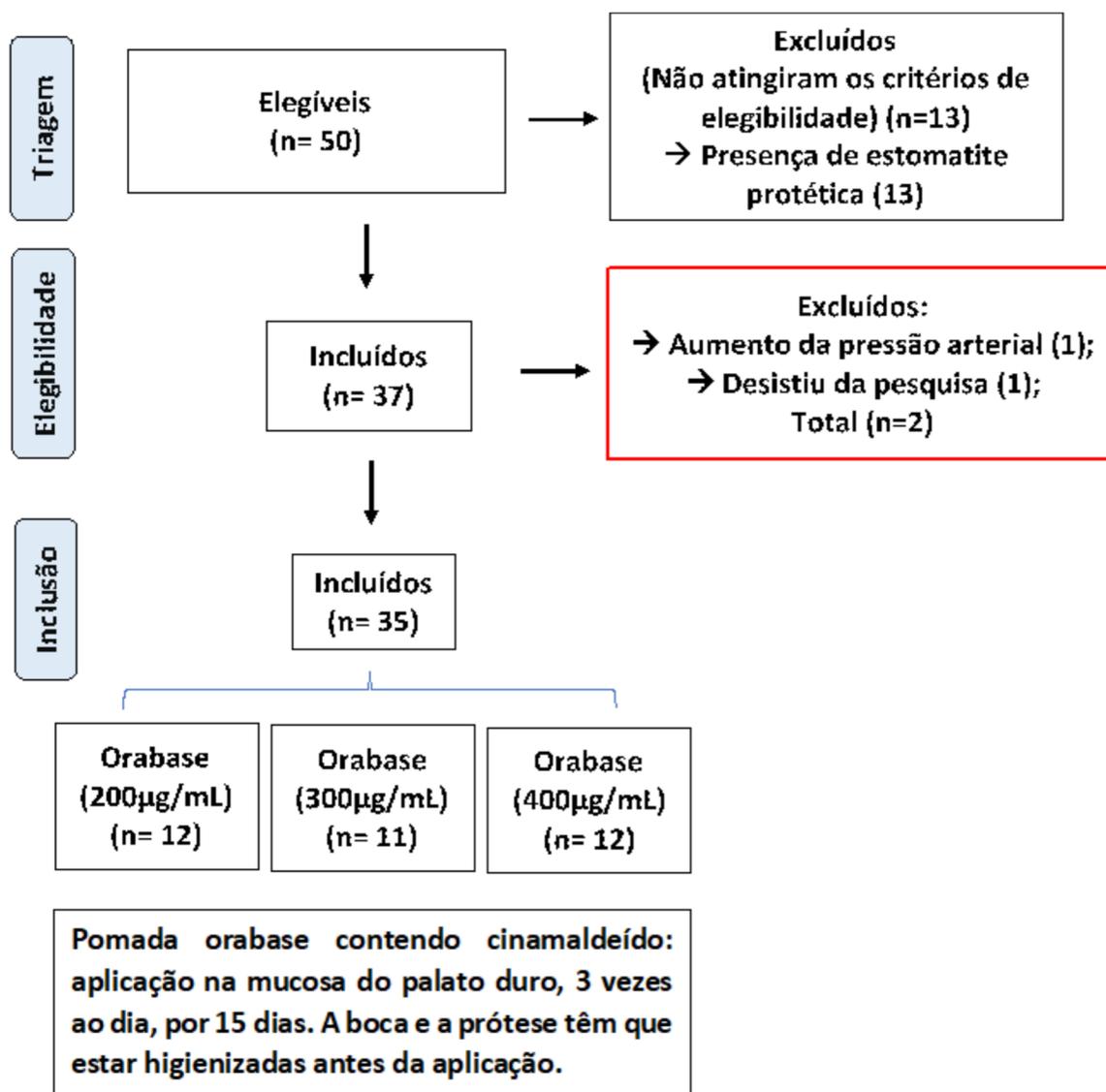
### 24 4.5.4 Delineamento do estudo

25 As amostras para realização dos exames clínicos e coleta de material com finalidade  
26 diagnóstica foram colhidas no setor de triagem do curso de Odontologia da Universidade  
27 Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil. As análises microbiológicas e citopatológicas  
28 foram realizadas no Laboratório de Farmacologia Experimental e Cultivo Celular da mesma  
29 instituição.

30 Um total de 50 indivíduos foram avaliados pelos critérios de elegibilidade e exclusão, e  
31 35 permaneceram após a aplicação destes critérios: 12 no grupo da pomada de 200µg/mL, 11

1 na de 300µg/mL e 12 na de 400µg/mL. Treze participantes tiveram diagnóstico positivo de  
 2 estomatite protética, sendo inelegíveis para receber a pomada, e dois foram excluídos, um por  
 3 ter desencadeado aumento de pressão arterial no primeiro dia de uso da pomada e outro porque  
 4 não quis mais participar da pesquisa. Sendo eliminados um total de 15 participantes (figura 14).

5



6

7 **Figura 14.** Diagrama de fluxo CONSORT para estudo clínico de Fase I em pacientes sem estomatite protética. Os  
 8 sujeitos do estudo receberam uma pomada em orabase divididos em três grupos (200µg/mL; 300µg/mL;  
 9 400µg/mL). A primeira coorte recebeu a pomada de 200 µg/mL. Essa concentração foi aumentada em coortes  
 10 subsequentes de 300 µg/mL e 400 µg/mL, usando um desenho 3+3 para avançar intragrupo entre os participantes.  
 11 A aplicação foi de forma tópica, três vezes ao dia, por 15 dias.  
 12

#### 1 4.5.5 Amostra

2 A quantidade de sujeitos foi escolhida segundo Friedman (FRIEDMAN et al., 2015),  
3 que define o estudo clínico de fase I como o pioneiro em seres humanos a ser realizado em  
4 pequenos grupos de pessoas voluntárias sadias, a fim de propor ou estabelecer uma evolução  
5 preliminar da segurança de um produto-teste. Os sujeitos foram alocados em três grupos  
6 experimentais (n=12; total de sujeitos: 36), constituídos a partir da definição de três  
7 concentrações do produto testado (as concentrações foram determinadas a partir dos ensaios  
8 não clínicos) (ALVES et al., 2020). Em cada grupo, três indivíduos receberiam o produto-teste  
9 para utilização e, caso não existisse evidência de efeitos adversos, mais três pessoas seriam  
10 incluídas, de modo que o grupo experimental fosse considerado concluído quando todos os  
11 sujeitos tivessem sido incluídos. Se dos três sujeitos que fizessem uso, dois tivessem  
12 apresentado uma experiência de toxicidade, para condução dos níveis subsequentes, seria  
13 incluída uma pessoa por vez, até completar o tamanho amostral por grupo experimental  
14 (GULATI et al., 2020). Cada sujeito foi controle de si mesmo.

#### 15 4.5.6 Intervenções

16 Foram realizados anamnese e exame clínico preliminar a fim de verificar a ausência ou  
17 presença de sinais e sintomas da estomatite protética. Após essa triagem inicial, foi feito exame  
18 micológico com o objetivo de contabilizar as UFCs antes e após o uso da pomada. A amostra  
19 biológica foi coletada, através de um *swab* estéril, da região de mucosa do palato duro e  
20 semeada meio ágar com cloranfenicol para leitura após 24 horas.

21 Os processos inflamatórios foram diagnosticados por citologia esfoliativa. Para a coleta  
22 do material, foi realizada a raspagem da superfície da mucosa de suporte da prótese com uma  
23 escova *Cytobrush* e posterior esfregação desta sobre uma lâmina de vidro. O material foi  
24 distribuído uniformemente sobre essa lâmina e fixado em álcool absoluto para ser corado com  
25 Panótico Rápido®. A análise da citoarquitetura foi feita utilizando o sistema Bethesda para  
26 relato de citologia cervical (NAYAR; WILBUR, 2018). Por fim, as lâminas foram examinadas  
27 em microscopia de luz (Nikon Eclipse Ci®, Tóquio, Japão) com ampliação de 40X, abertura  
28 de 0,1, índice de refração 1, câmera Nikon DS-Ri2, exposição 508ms, calibração  $\mu\text{m}/\text{px}$  de 2,2.

29 O cinamaldeído foi testado na forma de pomada em orabase, a qual está em processo de  
30 análise do depósito da patente no Instituto Nacional da Propriedade Industrial-INPI, sob número  
31 BR 1020190255102. Coortes de pacientes receberam doses crescentes das pomadas nas  
32 concentrações (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). A dose inicial foi feita com a pomada

1 de 200 µg/mL, administrada três vezes ao dia. A dose limitante seria definida a partir do  
2 aparecimento de efeitos adversos durante o tratamento, tais como os sinais e sintomas de  
3 inflamação (dor, rubor, edema), reações alérgicas e/ou ulcerações na mucosa. O surgimento  
4 desses efeitos foi acompanhado ao longo dos quinze dias de tratamento, e caso tivessem  
5 ocorrido, os voluntários seriam acompanhados até a remissão dos sinais e/ou sintomas. As  
6 avaliações de segurança e tolerabilidade foram realizadas durante e ao final do tratamento.

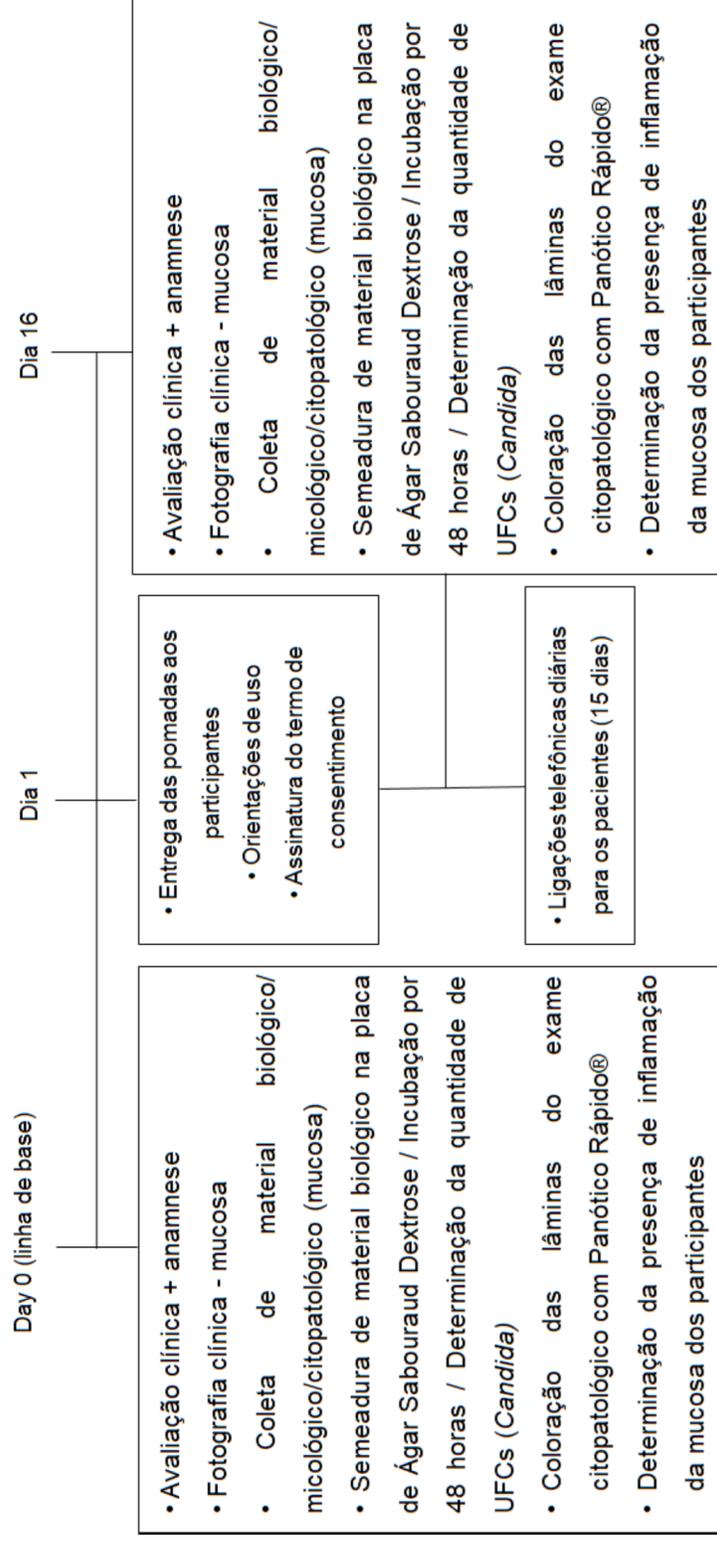
7 Após a inclusão dos sujeitos pelos critérios de elegibilidade, eles receberam uma  
8 pomada de 50 g cada, além de uma carta de orientação com as informações necessárias sobre o  
9 tratamento. Uma vez ocorrendo manifestações indesejadas, os voluntários foram orientados a  
10 interromper prontamente o protocolo de intervenção e comunicar-se com o pesquisador para  
11 que informações a respeito de sinais clínicos e sintomas indesejáveis, compatíveis com os  
12 supostos efeitos colaterais, fossem registrados.

13 O protocolo de intervenção consistiu na aplicação da pomada três vezes ao dia, a cada  
14 8 horas, por 15 dias. Também foram informados que antes da aplicação da pomada deveriam  
15 limpar a cavidade oral e a prótese, e após a aplicação das pomadas, eles deveriam permanecer  
16 isentos da ingestão de água e alimentos por 30 minutos. À noite, os participantes foram  
17 instruídos a colocar a prótese em um recipiente com água.

18 Durante todos os dias de intervenção, o pesquisador encarregou-se de manter, no  
19 mínimo, um contato verbal por dia com os participantes, através de ligações telefônicas,  
20 lembrando-os de cumprir o horário e o modo correto de utilização da pomada. Vinte e quatro  
21 horas após a última aplicação do produto-teste, uma anamnese e exame clínico minuciosos  
22 foram realizados acompanhados de exame laboratorial (micológico e citopatológico). Todo e  
23 qualquer efeito adverso foi devidamente registrado na ficha clínica. O protocolo de intervenção  
24 está descrito na figura 15.

25

26



**Figura 15.** Fluxograma do protocolo de intervenção (Adaptado de Consort Statement).

#### 1 4.5.7 Concordância intra-examinadores:

2 Os pesquisadores foram calibrados por dois especialistas, sendo um da área de  
3 odontologia/farmacologia e outro na área de patologia/farmacologia. A calibração resguardou  
4 a reprodutibilidade e fidedignidade dos dados obtidos, diminuindo a possibilidade de vieses.  
5 Mediante os percentuais de concordância e discordância foi efetuado o cálculo do coeficiente  
6 de *kappa* (*k*) para os diagnósticos clínicos e de citologia esfoliativa, inter e intra-examinadores,  
7 cujos valores foi de 1.

#### 8 **4.6 Análise estatística**

9 Os resultados formam expressos pela média  $\pm$  desvio-padrão após análise de  
10 normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov). A análise estatística dos dados foi realizada  
11 usando análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Para a  
12 citotoxicidade de embriões de peixe-zebra, os valores da concentração letal média ( $LC_{50}$ ) e os  
13 valores da concentração do fármaco que induz metade do efeito máximo ( $EC_{50}$ ) foram  
14 calculados por análise de regressão probit. A análise estatística foi realizada com o software  
15 BioEstat versão 5.3 com nível de significância de 5% e poder de 80%. Diferenças entre as  
16 variáveis sabor e efeitos indesejáveis dos produtos testados, características do uso de próteses  
17 e sintomas desencadeados nos participantes foram determinadas pelo teste Mann-Whitney e  
18 Kruskal-Wallis. As características do uso da prótese com relação ao tempo foram analisadas  
19 pelo ANOVA seguido do pós-teste de Tukey.

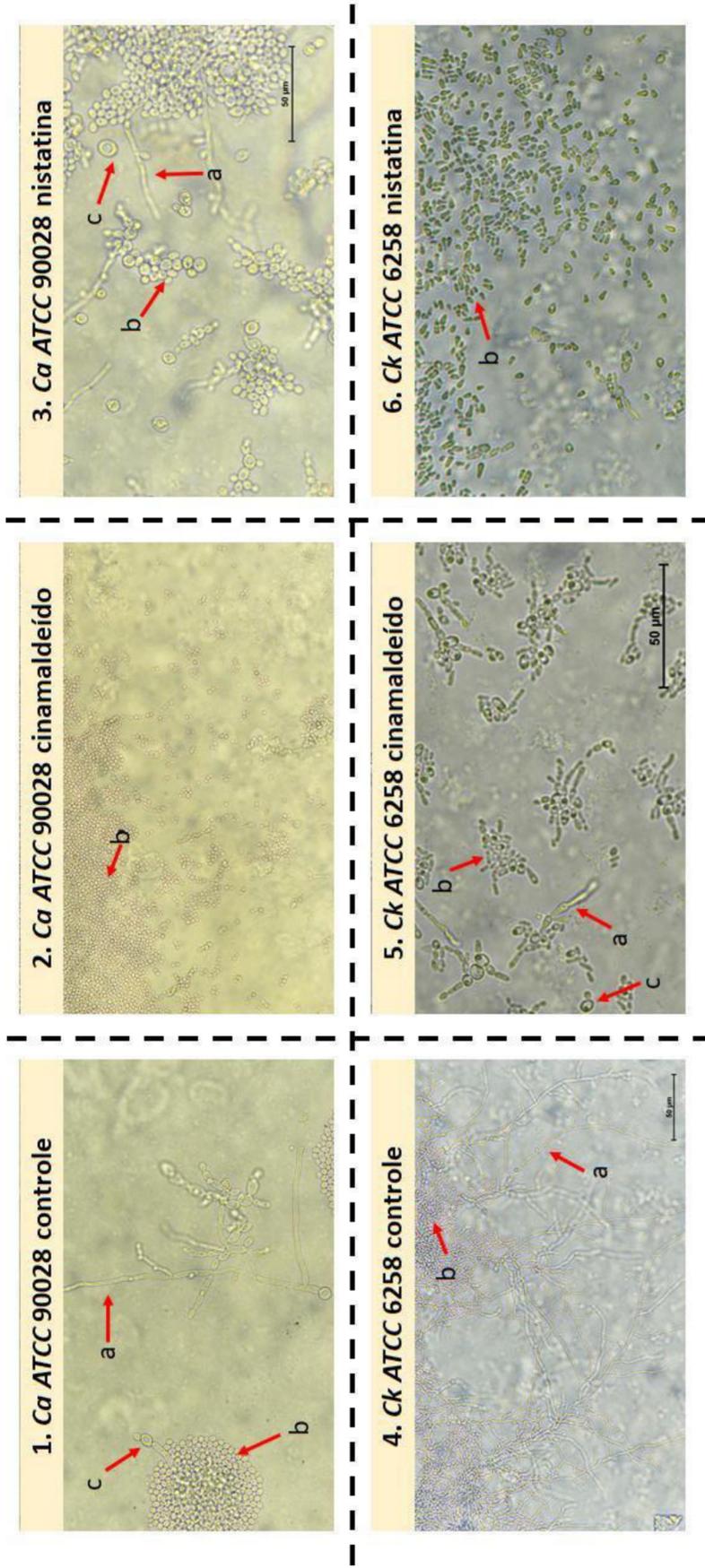
# *Resultados*

## 1 5 RESULTADOS

### 2 5.1 Ensaio *in vitro*

#### 3 5.1.1 Estudo do efeito do cinamaldeído sobre a micromorfologia de cepas de *C. albicans* ATCC 4 90028 e *C. krusei* ATCC 6258

5 A microcultura não tratada de *C. albicans* ATCC 90028 e *C. krusei* ATCC 6258 mostrou  
6 a presença de pseudo-hifas, blastoconídios e clamidósporos. Por outro lado, os tratamentos com  
7 cinamaldeído (37,83  $\mu\text{M}$ ) e nistatina (81,43  $\mu\text{M}$ ) promoveram alterações na forma filamentosa.  
8 As células tratadas com cinamaldeído apresentaram comprometimento do desenvolvimento  
9 celular, com expressão de raras pseudo-hifas e ausência de clamidoconídios (figura 16).



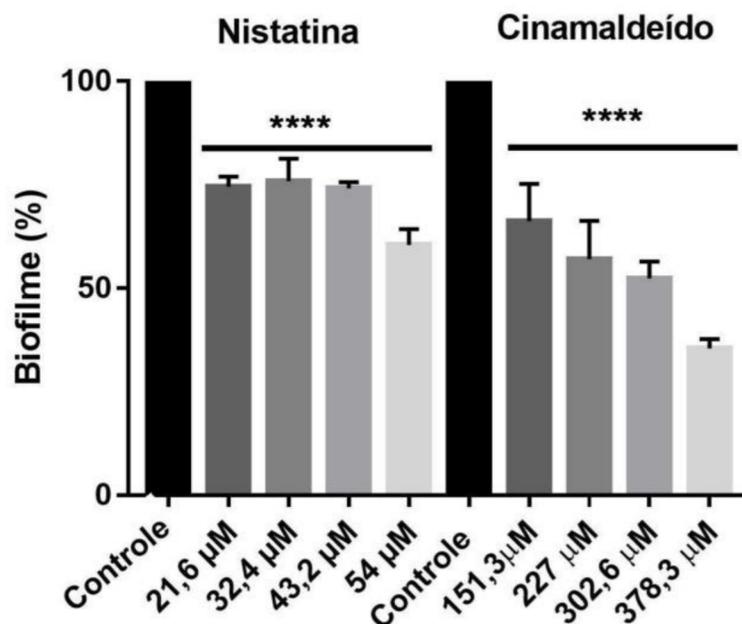
1

**Figura 16.** Imagens representativas (de um grupo experimental) dos efeitos do cinamaldeído e da nistatina na micromorfologia de *Candida albicans* ATCC 90028 e *Candida krusei* ATCC 6258. (1 e 4) controle de levedura; (2 e 5) tratamento com cinamaldeído a 37,83 µM; (3 e 6) tratamento com nistatina a 81,43 µM. a: pseudo-hifas. b: blastoconídios. c: clamidoconídios. Bar: 50µm (400x).

4

1 5.1.2 Estudo do efeito do cinamaldeído sobre a redução do biofilme de cepas do gênero *Candida*  
 2 spp.

3 O cinamaldeído promoveu redução de 33,75% a 64,52% na quantidade de biofilme, com  
 4 efeito dependente de concentração ( $p < 0,0001$ ). A nistatina, usada como controle, reduziu o  
 5 biofilme em 25,44% a 39,54% ( $p < 0,0001$ ). O veículo não interferiu na redução do biofilme. A  
 6 figura 17 mostra o efeito do cinamaldeído na redução do biofilme multiespécie de *Candida*.



7

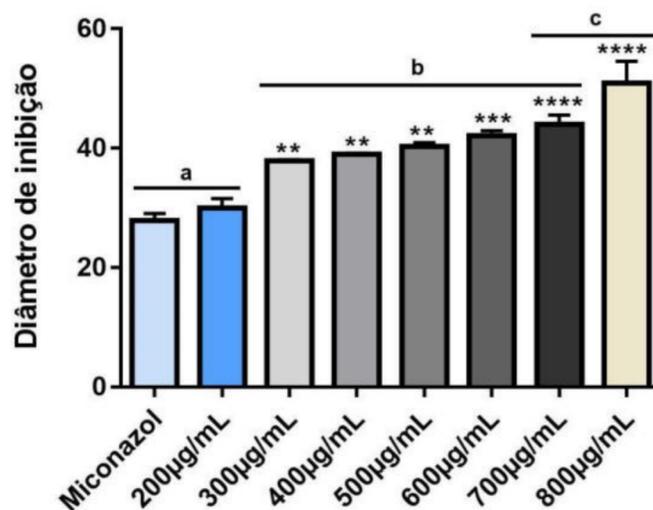
8 **Figura 17.** Efeito inibitório de cinamaldeído e nistatina contra biofilme de múltiplas espécies  
 9 de *Candida*. Os resultados apresentados como média  $\pm$  DP de três experimentos independentes  
 10 realizados em triplicata (ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey, \*\*\*\*  $P < 0,0001$  em  
 11 comparação com o controle).

12 Quando se analisou intragrupos, não houve diferença estatística entre as três menores  
 13 concentrações de nistatina (21,6; 32,4 e 43,2  $\mu\text{M}$ ). Contudo, quando comparou a maior  
 14 concentração (54 $\mu\text{M}$ ) com as demais concentrações-teste de nistatina, houve diferença com  
 15 relação à concentração de 43,2  $\mu\text{M}$  ( $p=0,0154$ ), a de 32,4 ( $p=0,0160$ ) e a de 21,6 ( $p=0,0340$ ).  
 16 Já com relação às concentrações-teste do cinamaldeído, também não houve diferença estatística  
 17 entre as três menores concentrações (151,3; 227 e 302,6 $\mu\text{M}$ ). Por outro lado, quando comparou  
 18 com a maior concentração (378,3 $\mu\text{M}$ ), houve diferença quando comparou a de 378,3 $\mu\text{M}$  versus  
 19 302,6  $\mu\text{M}$  ( $p=0,0038$ ); 378,3 versus 227 ( $p=0,0002$ ); 378,3 versus 151,3 ( $p < 0,0001$ ).

20

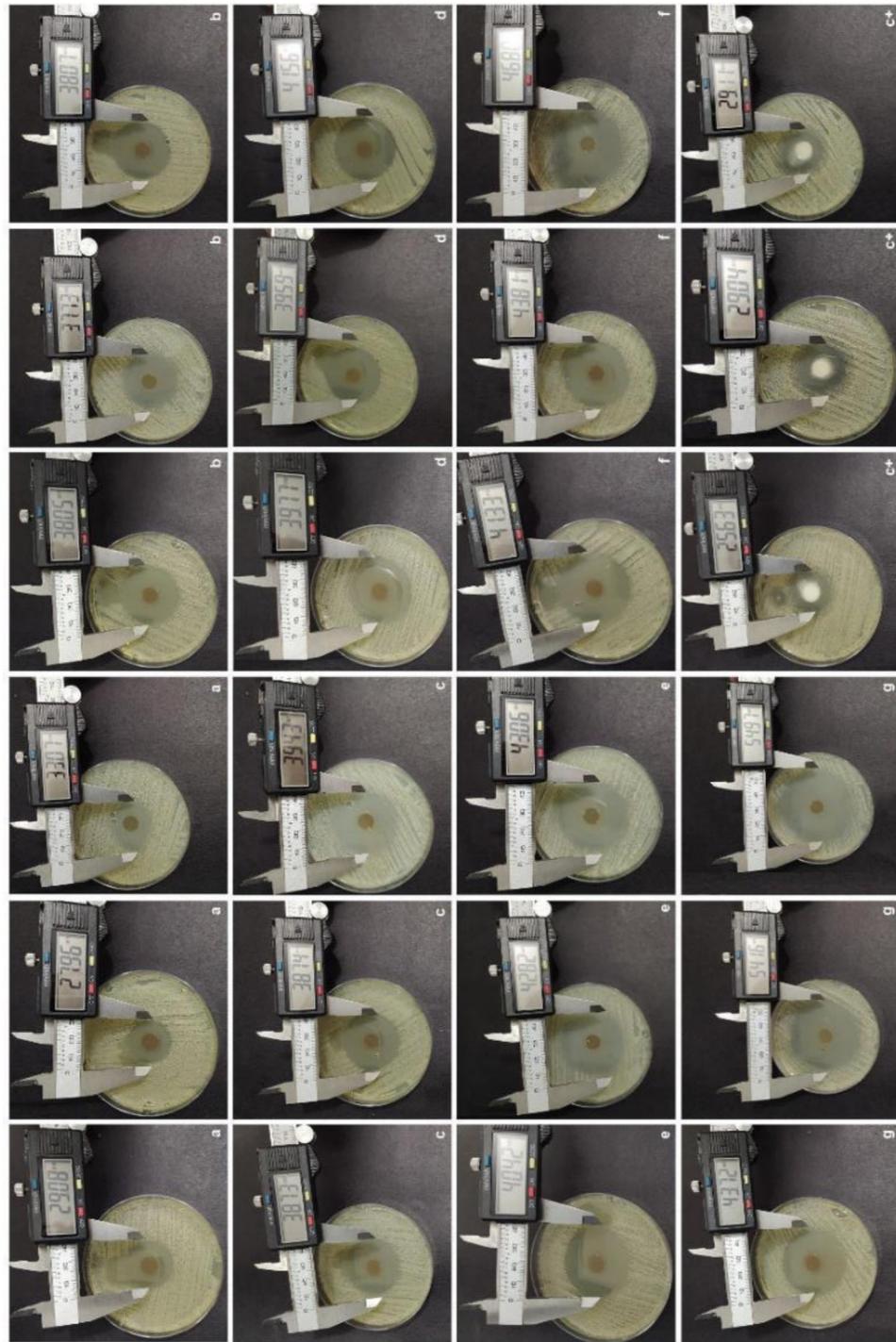
### 1 5.1.3 Teste de susceptibilidade fúngica

2 A cepa de *C. albicans* foi exposta à diferentes concentrações de cinamaldeído (12,5; 25;  
 3 50; 100; 200; 300; 400; 500; 600; 700 e 800 µg/mL) e a atividade antifúngica foi medida pelo  
 4 diâmetro do halo de inibição. Observou-se que esse halo formado pelas pomadas é dependente  
 5 de concentração. Não houve diferença estatística do miconazol com a pomada contendo  
 6 cinamaldeído na concentração de 200 µg/mL. A diferença com o controle positivo iniciou a  
 7 partir da concentração de 300 µg/mL, contudo, não houve diferença entre as pomadas de 300 a  
 8 700 µg/mL ( $p>0,05$ ). As pomadas com concentrações entre 12,5 e 100 µg/mL não apresentaram  
 9 atividade antifúngica (dados não mostrados). De acordo com os nossos resultados é possível  
 10 afirmar que a pomadas em orabase contendo cinamaldeído foi capaz e inibir crescimento de  
 11 *Candida albicans*, espécie comumente presente na cavidade oral de seres humanos (TELLES;  
 12 KARKI; MARSHALL, 2017). Os resultados da avaliação da atividade antifúngicas estão  
 13 apresentados nas figuras 18 e 19.



14

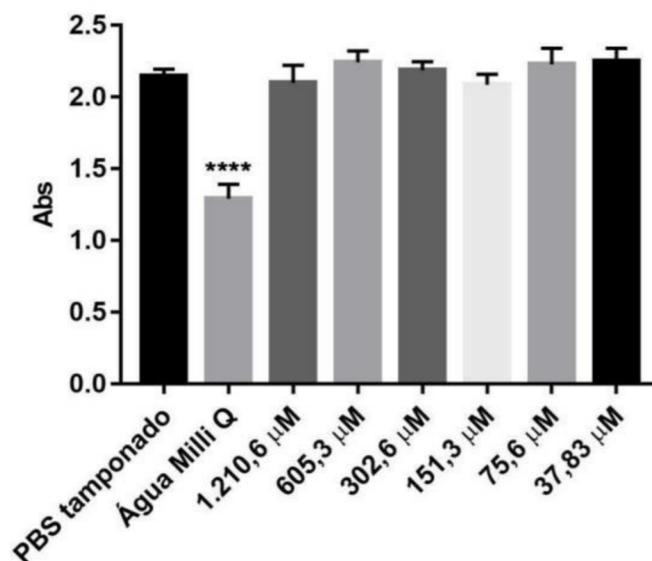
15 **Figura 18.** Efeitos antifúngicos da pomada-teste de cinamaldeído frente à cepa de *Candida*  
 16 *albicans*. O gráfico representa a média ± DP de três experimentos independentes realizados em  
 17 triplicado. ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey foi realizada para comparação entre os  
 18 grupos, \*\*\*\*  $P < 0,0001$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$  em relação ao controle positivo.  
 19



1  
 2 **Figura 19.** Imagens dos halos de inibição das pomadas. \*a (pomada de 200µg/mL); b (pomada de 300µg/mL); c (pomada de 400µg/mL); d (pomada de  
 3 500µg/mL); e (pomada de 600µg/mL); f (pomada de 700µg/mL); g (pomada de 800µg/mL); C+ (controle positivo – miconazol).  
 4

#### 1 5.1.4 Citotoxicidade em eritrócitos humanos

2 A citotoxicidade do cinamaldeído foi avaliada *in vitro* frente a eritrócitos humanos e os  
 3 resultados estão registrados na figura 20. Ele não promoveu alterações significativas na  
 4 viabilidade celular em diferentes concentrações (37,83  $\mu$ M - 1.210,6  $\mu$ M) quando comparado  
 5 ao controle negativo. O valor da concentração que produz 50% de hemólise ( $CH_{50}$ ) foi  
 6 considerado maior que 1.210,6  $\mu$ M.



7

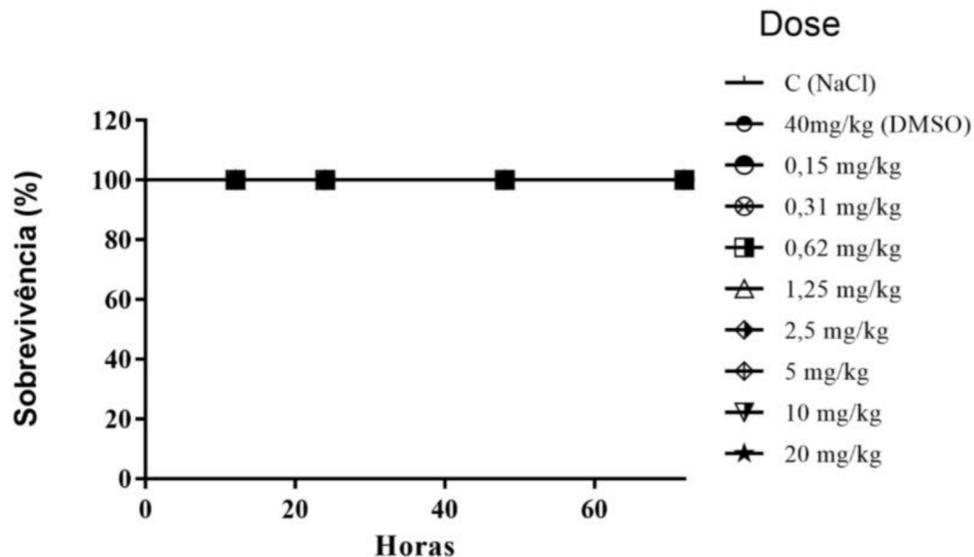
8 **Figura 20.** Efeitos citotóxicos do cinamaldeído contra os eritrócitos humanos. Eritrócitos humanos com  
 9 tipo sanguíneo A -, B +, AB + e O + foram incubados em diferentes concentrações cinamaldeído durante  
 10 1h a 37°C e a atividade hemolítica foi determinada por ensaio colorimétrico. O gráfico representa a  
 11 média  $\pm$  DP de três experimentos independentes realizados em duplicata. One-way ANOVA seguido  
 12 pelo pós-teste de Tukey foi realizado para comparação entre os grupos, sendo \*\*\*\*p<0,0001. Controle  
 13 positivo (água Milli Q); Controle negativo (solução tamponada de PBS).

## 14 5.2 Ensaios *in vivo*

### 15 5.2.1 Toxicidade em larvas de *Galleria mellonella*

16 A toxicidade sistêmica aguda do cinamaldeído foi avaliada através do modelo  
 17 alternativo com as larvas de *G. mellonella*. Altas doses dessa substância foram injetadas nas  
 18 larvas e sua sobrevivência foi monitorada por um período de 72 h. Como visto na figura 21, o  
 19 cinamaldeído não exerceu efeitos tóxicos nas larvas quando administrado em concentrações  
 20 com reconhecida atividade antibiofilme de *Candida* spp. (10 $\times$ CIM (37,8  $\mu$ M) - 378  $\mu$ M) (DA  
 21 NÓBREGA ALVES; MONTEIRO; ANDRADE et al., 2020), cuja concentração corresponde  
 22 à dose de 20 mg/Kg. Além disso, não foi possível encontrar a dose letal capaz de matar 50%

1 das larvas, e isso representa uma importante informação sobre avaliação da toxicidade de  
 2 cinamaldeído em modelo animal invertebrado e sugere a realização de ensaios com animais  
 3 com maior complexidade fisiológica (LAZARINI et al., 2018).



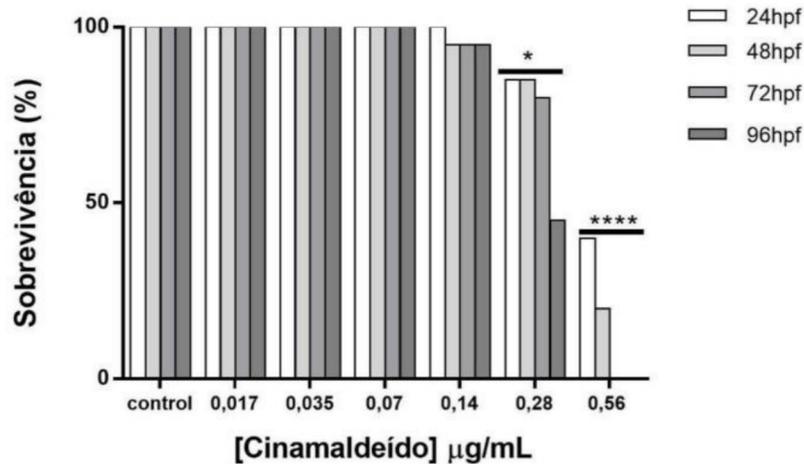
4

5 **Figura 21.** Toxicidade sistêmica do cinamaldeído no modelo de larvas de *Galleria mellonella*.  
 6 As larvas receberam tratamento com controle (C; solução NaCl 0,9%), veículo (DMSO) na  
 7 dose de 40 mg/Kg e cinamaldeído nas doses de 0,15; 0,31; 0,62; 1,25; 2,5; 5; 10 e 20 mg/Kg por  
 8 72h. Todos os grupos foram comparados com o grupo controle (C).  $P > 0,05$ , teste de log-rank.  
 9

#### 10 5.2.2 Toxicidade em embriões de peixe-zebra

11 A fim de determinar se o cinamaldeído foi tóxico para o desenvolvimento de peixes-  
 12 zebra, seus embriões foram expostos a concentrações crescentes desta substância. Este é o  
 13 primeiro relatório caracterizando os efeitos do cinamaldeído no desenvolvimento do peixe-  
 14 zebra.

15 A taxa de sobrevivência e malformações nos peixes-zebra foram medidos até 96hpf. O  
 16 cinamaldeído exerceu efeito dose-dependente sobre a sobrevivência do embrião para 96hpf  
 17 (figura 22). A sobrevivência demonstrada no gráfico para as concentrações de 0,017, 0,035,  
 18 0,07 e 0,14  $\mu\text{g/mL}$  não diferiram significativamente com o controle negativo, mas as maiores  
 19 concentrações testadas diminuíram a sobrevivência do embrião em 26,25% (para a  
 20 concentração de 0,28  $\mu\text{g/mL}$  vs controle;  $p = 0.024$ ) e em 85% (para a concentração de 0,56  
 21  $\mu\text{g/mL}$  vs controle;  $p < 0.0001$ ).  
 22



1

2 **Figura 22.** Sobrevivência do peixe-zebra após exposição ao cinamaldeído. Efeito do cinamaldeído na  
 3 taxa de sobrevivência de embriões e larvas de peixe-zebra após 96h de exposição. A presença de  
 4 qualquer efeito letal foi contada como mortalidade. N=20 embriões/ grupo. hpf: Horas pós fertilização.  
 5  $p= 0,024$  para a concentração  $0,28\mu\text{g/mL}$  e  $p< 0.0001$  para a concentração  $0,56\mu\text{g/mL}$  quando  
 6 comparado com o controle.

7

A embriotoxicidade do cinamaldeído incluiu *endpoints* de mortalidade e malformações.

8

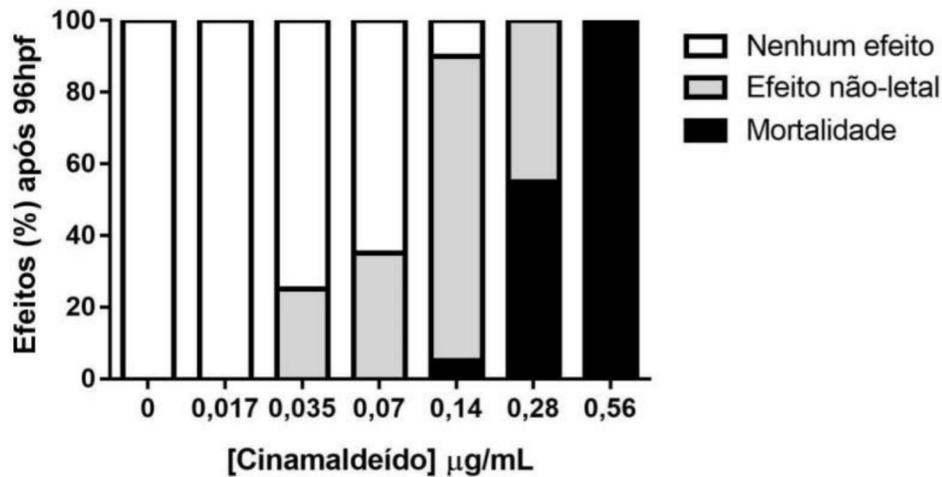
A figura 23 representa a visão geral dos efeitos cumulativos do cinamaldeído em embriões e

9

larvas do peixe-zebra após 96h de exposição. O número de desfechos não letais e letais se

10

agravaram conforme aumentaram as concentrações.



11

12 **Figura 23.** Visão geral dos efeitos cumulativos do cinamaldeído em embriões e larvas de peixe-zebra  
 13 após 96h de exposição. Nenhum efeito: características morfológicas semelhantes aos organismos não  
 14 tratados; Efeitos não-letais: presença de alterações subletais; Mortalidade: presença de desfechos de  
 15 mortalidade. N = 20 embriões/grupo. hpf: Hora pós-fertilização.

16

17

A tabela 1 mostra um painel geral da letalidade do cinamaldeído frente aos parâmetros de desenvolvimento do peixe-zebra. Na análise morfológica, observou-se que o cinamaldeído induziu alterações em embriões de peixe-zebra a partir da concentração de 0,035 µg/mL (LOAEL), como atraso na eclosão do ovo ( $EC_{50} = 0,097$  µg/mL) e edema pericárdico ( $CE_{50} = 0,105$  µg/mL). A menor concentração testada para o não aparecimento de efeitos adversos nos embriões (NOAEL) foi 0,017 µg/mL.

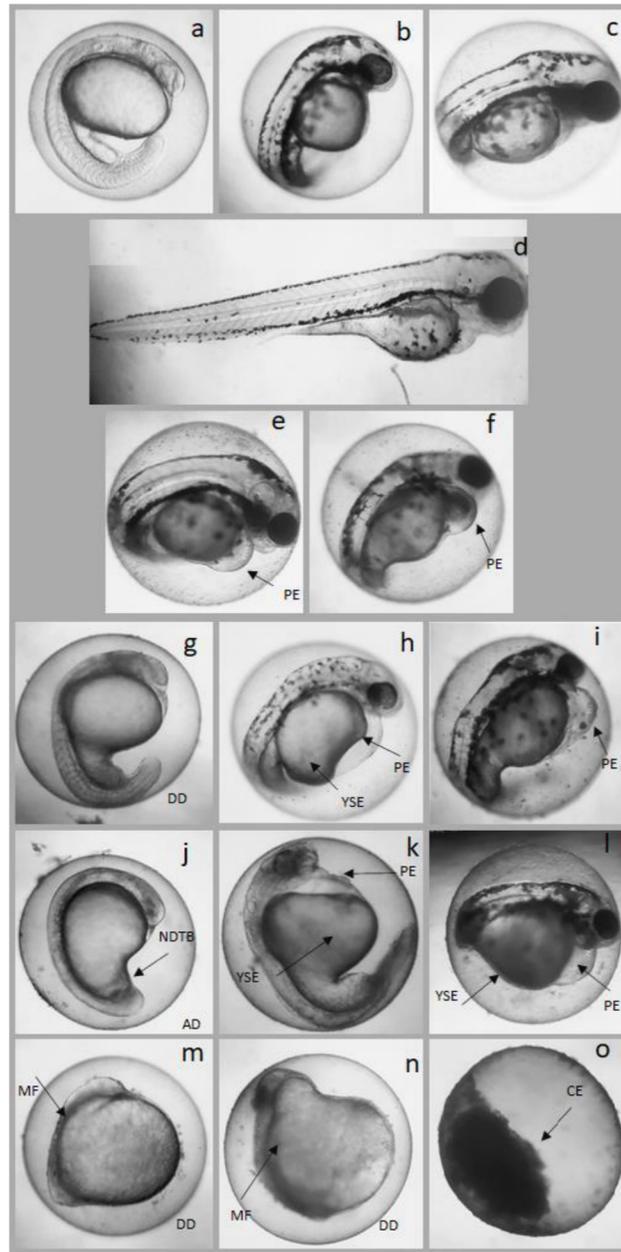
**Tabela 1.** Efeitos do cinamaldeído nos parâmetros de desenvolvimento do peixe-zebra após 96hpf

96 h – Efeitos adversos embriotoxicológicos	LC <sub>50</sub>	EC <sub>50</sub>	LOAEL	NOAEL
Mortalidade ( <i>Todos os efeitos letais</i> )	0,311	NA	0,14	0,07
Coagulação de embriões viáveis			0,14	0,07
Ausência de formação de somito			-	-
Falta de batimento cardíaco			0,28	0,14
Não desprendimento do botão da cauda do saco vitelínico			0,28	0,14
<i>Efeitos não-letais</i>				
Má-formação do olho	-	-	-	-
Má-formação dos otólitos	-	-	-	-
Má-formação da boca	-	-	-	-
Má-formação da coluna	-	-	-	-
Pigmentação corporal	-	-	-	-
Atraso na incubação do ovo	-	0,097	0,035	0,017
Edema de saco vitelínico	-	NC	0,035	0,017
Má-formação corporal	-	NC	0,14	0,070
Edema pericárdico	-	0,105	0,035	0,017
Edema de cabeça	-	-	-	-
Coagulação sanguínea	-	-	-	-
Tamanho menor	-	-	-	-
Atraso no desenvolvimento	-	NC	0,14	0,070

LOAEL (Lowest-observed-adverse-effect level) e NOAEL (No observed adverse effect level) em µg/mL; (-): Nada observado; LC<sub>50</sub> (Concentração Letal Mediana) e EC<sub>50</sub> (Concentração Efetiva Mediana) valores em µg/mL; (NA): Não aplicável. (NC): Não calculado

1 O cinamaldeído induziu mortalidade nas três maiores concentrações (0,14  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 0,28  
 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 0,56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), por outro lado, suas concentrações tóxicas causaram alterações  
 3 morfológicas como atraso na incubação do ovo, edema de saco vitelínico, má-formação  
 4 corporal, edema pericárdico e retardo no desenvolvimento (figura 24).

5



6

7 **Figura 24.** Efeitos letais e não letais observados em embriões e larvas de peixe-zebra após exposição a  
 8 concentrações crescentes de cinamaldeído durante 96 h. (a), (b), (c) e (d) são organismos controle com  
 9 desenvolvimento normal após 24, 48, 72 e 96 hpf, respectivamente, expostos apenas ao meio E3; (e) e  
 10 (f) embriões com 96 hpf, expostos a 0,07 e 0,035  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , respectivamente, ambos com edema  
 11 pericárdico (PE); (g) embrião com 24 hpf exposto a 0,14  $\mu\text{g}/\text{mL}$  apresentando atraso no  
 12 desenvolvimento (DD); (h) e (i) embriões com 48 e 96 hpf, respectivamente, expostos a 0,14  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ,

1 ambos com edema pericárdico (PE); (j) embrião após 24 hpf, exposto a 0,28 µg/mL, apresentando  
 2 retardo de desenvolvimento (DD) e não desprendimento da base da cauda (NDTB); (k) e (l) embriões  
 3 com 48 e 96 hpf expostos a 0,28 µg/mL apresentando edema pericárdico (EP) e edema do saco vitelino  
 4 (YSE), respectivamente e (l) edema do saco vitelino (YSE); (m) e (n) são embriões com 24 e 48 hpf,  
 5 respectivamente, expostos a 0,56 µg/mL de cinamaldeído, apresentando malformação (MF) e atraso de  
 6 desenvolvimento (DD); (o) embrião coagulado (CE) após 72 h de exposição a 0,56 µg/mL.

### 7 5.2.3 Avaliação da genotoxicidade

8 O tratamento dos animais com dose única de 4 mg/Kg da amostra não induziu aumento  
 9 do número de eritrócitos micronucleados no sangue periférico ( $7,8 \pm 0,3$ ), quando comparado  
 10 ao grupo controle ( $8,6 \pm 0,4$ ). Como esperado, a ciclofosfamida induziu aumento significativo  
 11 no número de eritrócitos micronucleados ( $18,4 \pm 0,5$ ;  $p < 0,05$ ), em comparação ao grupo  
 12 controle ( $8,6 \pm 0,4$ ) (Tabela 2).

13

**Tabela 2.** Efeito da administração de dose única de cinamaldeído (4 mg/kg) e ciclofosfamida (50 mg/kg) no número de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos após 48 horas do tratamento.

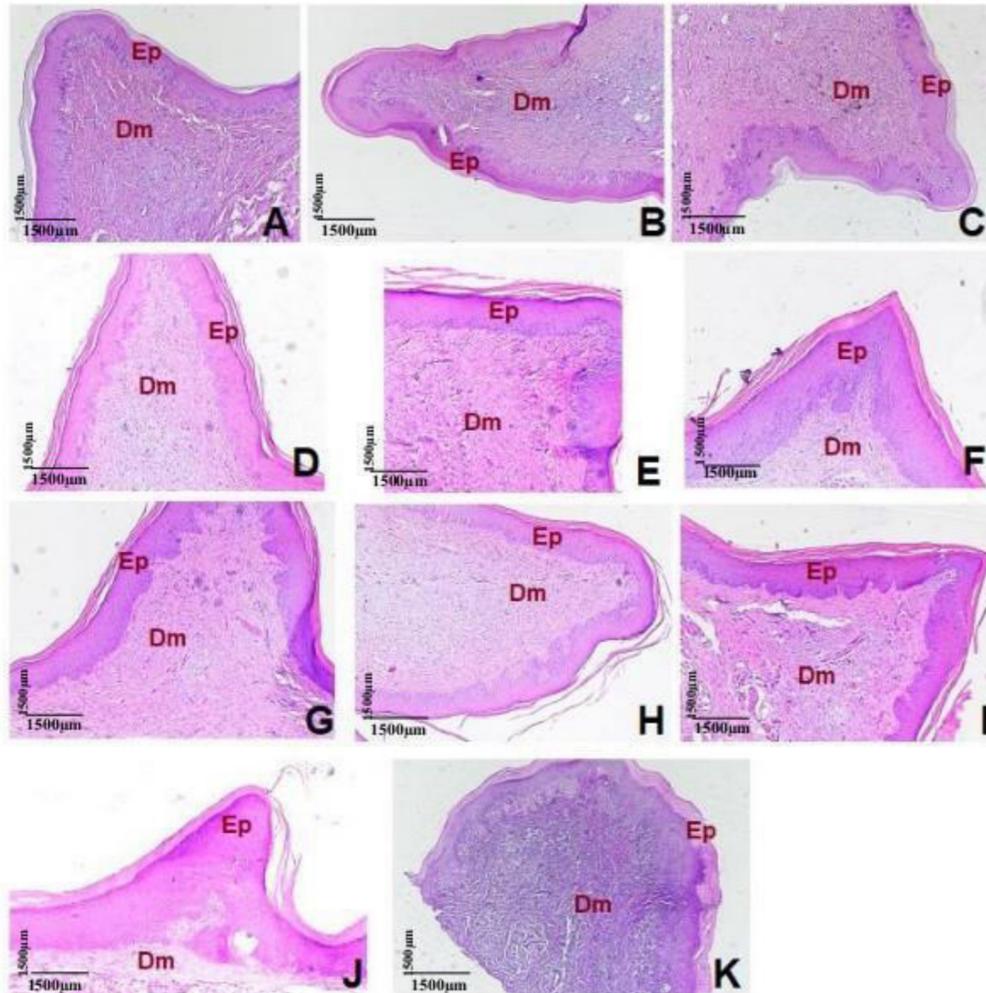
<b>Grupos</b>	<b>Dose (mg/kg)</b>	<b>Nº de células Micronucleadas</b>
Controle	-	$8,6 \pm 0,4$
Ciclofosfamida	50	$18,4 \pm 0,5^a$
Cinamaldeído	4	$7,8 \pm 0,3$

Dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média de cinco animais. <sup>a</sup>  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle (12% de Tween 80) analisados por ANOVA seguido de Dunnet e Tukey.

14

### 15 5.2.4 Estudo de toxicidade em mucosa oral ceratinizada de ratos

16 Os resultados mostraram que os animais se mantiveram saudáveis e não apresentaram  
 17 evidências clínicas e/ou macroscópicas de inflamação em todas as concentrações testadas (25;  
 18 50; 100; 200; 300; 400; 500; 600 e 700µg/mL). As análises histológicas dos espécimes do  
 19 palato, apresentaram preservação de epiderme (Ep), com queratinócitos e células basais sem  
 20 alterações dermatopatológicas, seguido da preservação da derme (Dm) a qual apresentou-se  
 21 sem alterações vasculares e/ou celulares, compatíveis com a mucosa normal  
 22 independentemente da dose testada. Estes resultados são mostrados na figura 25.



1  
2 **Figura 25.** Histologia do palato duro dos ratos após uso das pomadas em orobase contendo cinamaldeído  
3 nas diferentes concentrações (H/E, x10). A- Grupo pomada concentração 25 µg/mL; B- grupo pomada  
4 concentração 50 µg/mL; C- grupo pomada concentração 100 µg/mL; D- Grupo pomada concentração  
5 200 µg/mL; E- Grupo pomada concentração 300 µg/mL; F- Grupo pomada concentração 400 µg/mL;  
6 G- Grupo pomada concentração 500 µg/mL; H- Grupo pomada concentração 600 µg/mL; I- Grupo  
7 pomada concentração 700µg/mL; J e K- Grupos controles pomada com a base pura.

### 8 **5.3 Ensaio clínico fase I**

9 O recrutamento, tratamento e acompanhamento dos participantes foram realizados entre  
10 20 de janeiro de 2020 a 15 de fevereiro de 2021. Dos 35 participantes incluídos, 66,7% foram  
11 do sexo feminino, com média de idade de 65 ( $\pm 10,2$ ) anos (range 42-85), sendo 71% da amostra  
12 composta por idosos. No uso da pomada, apenas um evento adverso leve foi registrado (Slight  
13 Burning). Seis pacientes (17%) do sexo feminino relataram um leve ardor assim que aplicava a  
14 pomada, mas que logo havia a remissão desse sintoma. As principais características dessa  
15 amostra estão descritas na tabela 3.

16

**Tabela 3.** Características do uso de dentaduras e sintomas nos participantes de cada grupo

Grupos	n	Uso da prótese				Sintomas
		Tempo de edentulismo (anos)	Tempo de uso da prótese (anos)	Uso contínuo da prótese	Prótese sem retenção e estabilidade	Leve queimação
200µg/mL	12	28.75 ± 11.37 <sup>a</sup>	6 ± 4.49 <sup>b</sup>	91.7% <sup>cFg</sup>	50% <sup>d</sup>	0% <sup>Ef</sup>
300µg/mL	11	30.09 ± 13.78 <sup>a</sup>	2.31 ± 2.86 <sup>b</sup>	81.8% <sup>cfG</sup>	27.3% <sup>d</sup>	36,4% <sup>Ef</sup>
400µg/mL	12	25.16 ± 19.57 <sup>a</sup>	4.18 ± 3.12 <sup>b</sup>	33.3% <sup>CFG</sup>	33.3% <sup>d</sup>	16,7% <sup>ef</sup>

\*Nenhum paciente apresentou os sintomas: alteração do paladar, prurido, descamação, eritema, alteração da cor da prótese e/ou dentes e queimação (moderada e intensa)

Letras minúsculas iguais nas colunas indicam que não há diferenças significativas.

<sup>a</sup>p-valor= 0.96 (200µg/mL X 300µg/mL); 0.836 (200µg/mL X 400µg/mL); 0.96 (300µg/mL X 200µg/mL); 0.72 (300µg/mL X 400µg/mL); 0.836 (400µg/mL X 200µg/mL); 0.72 (400µg/mL X 300µg/mL), ANOVA.

<sup>b</sup>p-valor= 0.1 (200µg/mL X 300µg/mL); 1 (200µg/mL X 400µg/mL); 0.1 (300µg/mL X 200µg/mL); 0.1 (300µg/mL X 400µg/mL); 1 (400µg/mL X 200µg/mL); 0.1 (400µg/mL X 300µg/mL), ANOVA.

<sup>cf</sup>p-valor= 0.49 (200µg/mL X 300µg/mL); 0.004 (200µg/mL X 400µg/mL); 0.02 (300µg/mL X 400µg/mL), MANN-WHITNEY. <sup>cf</sup>p-valor= 0.005, KRUSKAL-WALLIS.

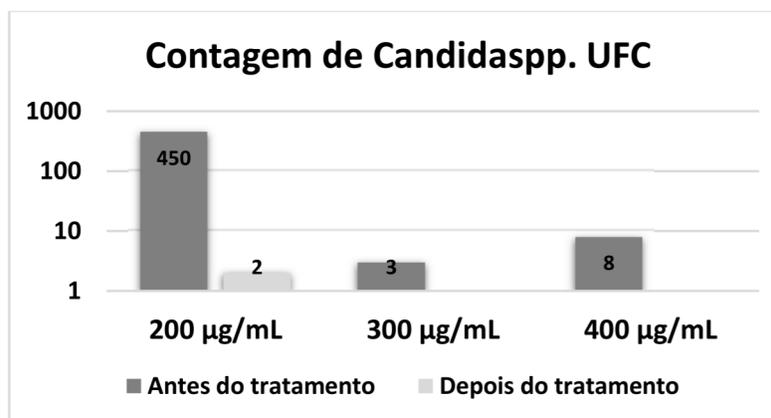
<sup>d</sup>p-valor = 0.27 (200µg/mL X 300µg/mL); 0.41 (200µg/mL X 400µg/mL); 0.758 (300µg/mL X 400µg/mL), MANN-WHITNEY; <sup>d</sup>p-valor = 0.51, KRUSKAL-WALLIS.

<sup>ef</sup>p-valor = 0.02 (200µg/mL X 300µg/mL); 0.14 (200µg/mL X 400µg/mL); 0.29 (300µg/mL X 400µg/mL), MANN-WHITNEY; <sup>ef</sup>p-valor = 0.07, KRUSKAL-WALLIS.

1

2 Os grupos apresentaram características de homogeneidade com relação à quantidade de  
3 UFCs, os aspectos clínicos e citopatológicos antes e após o uso das pomadas, indicando uma  
4 provável segurança das mesmas para uso no ensaio clínico fase II (ANOVA; p>0,05). A análise  
5 micológica, mostrou que o uso das pomadas promoveu uma redução em 99% na quantidade de  
6 UFCs de *Candida* spp. Quando se compara entre grupos, os de 300 e 400µg/mL chegaram a  
7 uma redução de 100%. A figura 26 mostra o número total de UFC antes e depois do uso das  
8 pomadas de 200, 300 e 400µg/mL.

9

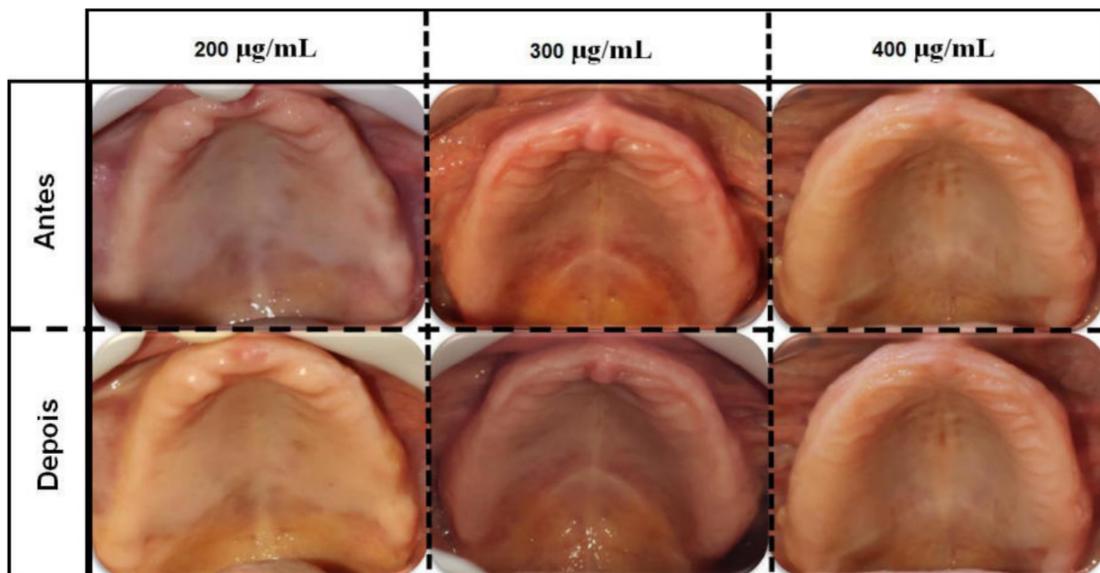


10

11 **Figura 26.** Comparação do número total de UFC antes e após o tratamento com as pomadas orabase  
12 (200µg/mL; 300µg/mL; 400µg/mL) na mucosa oral de pacientes após 15 dias de uso.

1 Os exames clínicos e citopatológicos da mucosa oral mostraram que as pomadas nas  
2 três concentrações testadas, não desencadearam inflamação nas mucosas saudáveis. Nos  
3 exames clínicos, as mucosas se apresentaram rosadas, sem áreas avermelhadas, sem  
4 sangramentos, inchaços e sem sintomatologia dolorosa (Figura 27). Já a análise das células  
5 escamosas bucais, em todas as concentrações testadas, apresentou células poligonais, amplas,  
6 com núcleos picnótico e ausência de alterações citoplasmáticas como inclusões ou  
7 degenerações, compatíveis com células escamosas superficiais saudáveis. Observou-se ainda  
8 ausência de micro-organismos (Figura 28).

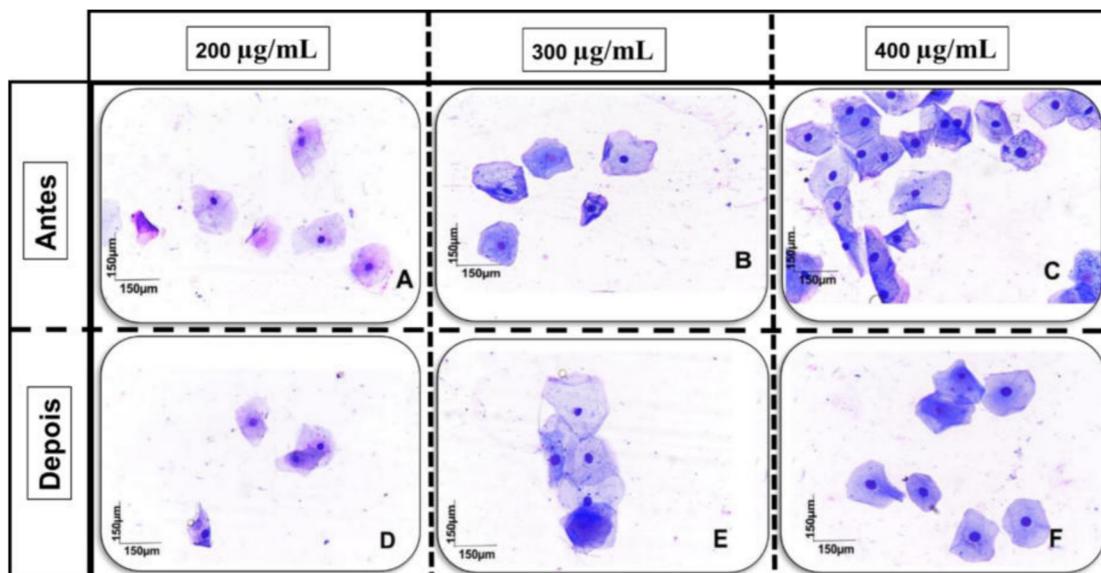
9



10

11 **Figura 27.** Aspectos clínicos da mucosa oral antes e após o uso das pomadas contendo cinamaldeído  
12 nas concentrações de 200, 300 e 400µg/mL.

13



1

2 **Figura 28.** Análise das células escamosas bucais. A- 200µg/mL antes; B- 300µg/mL antes; C-  
3 400µg/mL antes; D- 200µg/mL depois; E- 300µg/mL depois; F- 400µg/mL depois.

# *Discussão*

## 1 6 DISCUSSÃO

2 A utilização dos antifúngicos atualmente utilizados para tratamento de infecções orais  
3 limita-se devido, especialmente aos seguintes fatores: limitado número de fármacos disponíveis  
4 (VAN DAELE et al., 2019); crescente resistência antimicrobiana (PERLIN; RAUTEMAA-  
5 RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017; PRASAD; NAIR; BANERJEE, 2019); e  
6 aumento da prevalência de infecções graves causadas por *Candida* spp. (VAN DAELE et al.,  
7 2019). O comprovado potencial antifúngico do cinamaldeído (ALVES et al., 2020) sustentou  
8 as hipóteses apresentadas para este estudo, visando a proposição de uma formulação  
9 farmacêutica eficaz e segura para utilização clínica com objetivo de tratar infecções fúngicas  
10 na cavidade oral provocadas por *Candida* spp.

11 A investigação teve início a partir da avaliação da atividade antifúngica do cinamaldeído  
12 na forma isolada frente às espécies do gênero *Candida*. Buscou-se demonstrar a capacidade do  
13 cinamaldeído em reduzir o biofilme e alterar a micromorfologia fúngica, visto que o objetivo  
14 destes testes seria desenvolver uma formulação farmacêutica com a finalidade de tratar  
15 infecções fúngicas na cavidade oral, a qual está relacionada, muitas vezes, com a formação de  
16 biofilme multiespécie (WALL et al., 2019).

17 A capacidade das espécies de *Candida* de produzir estruturas filamentosas, como  
18 pseudo-hifas ou hifas, está intimamente relacionada à virulência fúngica. O desenvolvimento  
19 desta estrutura aumenta a capacidade das células fúngicas de invadir os tecidos do hospedeiro  
20 (FERREIRA et al., 2017). A redução da extensão das pseudo-hifas em *C. albicans* e *C. krusei*  
21 pelo cinamaldeído destaca seus potentes efeitos antivirulentos. Este resultado está de acordo  
22 com estudo prévio (KHAN et al., 2017).

23 A adesão do biofilme é considerada um importante fator de virulência visto que  
24 contribui significativamente para o desenvolvimento de resistência aos fármacos  
25 (PAKKULNAN et al., 2019; SKOWRON; WIKTORCZYK et al., 2019). Esse foi o primeiro  
26 estudo que demonstrou os efeitos do cinamaldeído na redução de biofilme composto por  
27 multiespécie de *Candida* spp., com uma redução que variou de 33,75% a 64,52%. Tal fato  
28 aponta para o seu uso como antifúngico em pacientes acometidos por candidíase oral, os quais  
29 já se encontram com o biofilme formado.

30 Foi avaliada a atividade antifúngica da pomada em orabase contendo cinamaldeído.  
31 Essa forma farmacêutica foi escolhida devido a vantagem de proporcionar melhor aplicação e  
32 espalhamento do produto sobre a região afetada, além de promover adesão ao sítio da lesão  
33 tecidual. Além disso, essa formulação por conter aromatizantes em sua composição, melhora a

1 aceitação do produto e aumenta a adesão terapêutica, assim como pode funcionar como uma  
2 barreira mucoprotetora para lesões ulceradas orais (SILVA et al., 2020). Assim, os resultados  
3 obtidos a partir desse ensaio colaboraram para estimar e definir concentrações do produto, na  
4 forma de pomada em orabase, que poderiam ser utilizadas em novos estudos, com objetivo de  
5 definir a segurança no modelo animal e em seres humanos.

6 Apesar de serem numerosos os estudos *in vitro* com produtos naturais na literatura e os  
7 resultados serem otimistas para infecções fúngicas (GONZÁLEZ-BURGOS e GÓMEZ-  
8 SERRANILLOS, 2018), verifica-se um baixo número de estudos para avaliação da segurança  
9 e eficácia clínica dos mesmos (ALVES et al., 2021).

10 Existem apenas três estudos na literatura que testaram o uso tópico do cinamaldeído.  
11 Destes, dois estudos avaliaram o uso do cinamaldeído em modelo *in vivo*, sendo um, usado para  
12 tratar feridas decorrentes de infecções provocadas por *Pseudomonas aeruginosa* (FERRO et  
13 al., 2019) e o outro testado na cicatrização de feridas em camundongos diabéticos (DAEMI et  
14 al., 2019). Com isso, foi necessário avançar nas investigações com relação à sua toxicidade e  
15 segurança em modelo animal e com seres humanos.

16 A toxicidade também é um grande desafio no desenvolvimento de fármacos pela  
17 indústria farmacêutica, visto que muitos produtos com aplicação em saúde têm o potencial de  
18 causar efeitos indesejáveis (FRENZEL; TESCHKE, 2016). Os fatores que influenciam a  
19 toxicidade estão relacionados com a estrutura química da molécula, a dose utilizada e a forma  
20 de uso (CAMPOS et al, 2016). Por isso, estudos com diferentes modelos investigativos para  
21 avaliação de toxicidade dos novos produtos com finalidade terapêutica são imprescindíveis para  
22 sustentar hipóteses de pesquisas que objetivam avaliar segurança e eficácia a partir ensaios  
23 clínicos controlados randomizados em seres humanos (SISON-YOUNG et al., 2017).

24 O estudo de novas moléculas antifúngicas deve considerar possíveis efeitos tóxicos nas  
25 células humanas. A análise toxicológica em eritrócitos indica possíveis danos promovidos por  
26 moléculas à membrana celular, estrutura responsável pela manutenção de funções celulares  
27 como transporte passivo e ativo e produção de gradientes iônicos e elétricos (SUWALSKY et  
28 al., 2008). O teste *in vitro* para atividade hemolítica é considerado um método alternativo e  
29 preliminar para a triagem de moléculas bioativas quanto à sua citotoxicidade. Este teste rápido  
30 altamente reprodutível, indica os possíveis danos à membrana celular dos eritrócitos produzidos  
31 por um determinado agente (FARAG; ALAGAWANY, 2018). Em nosso estudo, o tratamento  
32 com cinamaldeído em concentrações eficazes contra biofilme multiespécies de espécies de  
33 *Candida* (151,3 - 378,3µM) não causou efeitos citotóxicos em eritrócitos humanos.

1 Em avaliações de potencial farmacológico e toxicológico de novos produtos, a procura  
2 por minimizar a utilização de animais de laboratório tem levado ao desenvolvimento de  
3 métodos alternativos. O novo cenário ético, implica em um controle mais rigoroso para a  
4 utilização de vertebrados em estudos *in vivo*, surgindo com isso, uma alternativa aos roedores  
5 em modelo de invertebrados, que é o das larvas da *G. mellonella* (CUTULI et al., 2019). Este  
6 modelo, além de viável, por ser um modelo de baixo custo e validado (DE ALMEIDA  
7 ROCHELLE et al., 2016; FREIRES; SARDI; DE CASTRO; ROSALEN, 2017) , fornece  
8 respostas em curto período. Adicionalmente, o sistema imunológico desse animal invertebrado  
9 se assemelha ao de mamíferos (BENADUCCI et al., 2016; IGNASIAK; MAXWELL, 2017).

10 Em um estudo usando *G. mellonella*, os autores avaliaram a toxicidade do extrato de  
11 frutas. Nele, foi demonstrado o extrato da *Sageretia elegans* e *Byrsonima arthropoda* causaram  
12 efeitos de toxicidade aguda nas larvas e *Spondias mombin* reduziu a sobrevivência da população  
13 de larvas em quase 50% quando comparada com a veículo ( $p < 0,05$ ) (SOARES et al., 2019). Já  
14 outro que avaliou a toxicidade aguda do extrato da polpa da fruta da *Eugenia brasiliensis*,  
15 constatou que tal extrato não exerceu efeitos tóxicos nas larvas quando administrado em  
16 concentrações de antibiofilme (10×CIM) (LAZARINI et al., 2018). Não há estudos de  
17 toxicidade do cinamaldeído ou extratos de plantas que contenham cinamaldeído, frente às larvas  
18 da *G. mellonella*. Nossos resultados mostraram que nenhuma das doses sistêmicas (0.15 –  
19 20mg/Kg) resultou na morte das larvas. Essa diferença pode ser explicada devido às diferentes  
20 partes da planta (casca e extrato da polpa de frutas) utilizadas nos estudos. O cinamaldeído é  
21 extraído da casca das espécies do gênero *Cinnamomum*, e nos outros estudos supracitados os  
22 compostos em análise foram extraídos das polpas das frutas. Além disso, os valores das doses  
23 testadas foram diferentes já que elas foram calculadas em cima do valor antibiofilme de cada  
24 substância.

25 Outro modelo animal alternativo que tem se mostrado útil para toxicologia,  
26 especialmente na triagem de fármacos e estudos de doenças humanas (GAMSE; GORELICK,  
27 2016), é a toxicologia utilizando embriões de peixe-zebra. É um modelo de vertebrado  
28 confiável, controlável e reproduzível (MCGRATH; LI, 2008). Por outro lado, alguns autores  
29 apoiam a ideia de que esse modelo experimental é muito sensível para avaliação de toxicidade,  
30 e, além disso, os estágios iniciais de desenvolvimento são comumente os mais sensíveis à  
31 exposição química (HALLARE; KÖHLER; TRIEBSKORN, 2004).

32 Muitas vezes, as respostas tóxicas das substâncias são conservadas entre o peixe-zebra  
33 e os estudos toxicológicos em humanos (BAMBINO; CHU, 2017), contudo, estudos já  
34 demonstraram que a toxicidade aguda do cinamaldeído foi relativamente baixa, com valores de

1 DL50 (dose letal 50%) variando entre 0,6 a mais de 2g/Kg, em espécies como ratos,  
2 camundongos e porco da índia (GOWDER, 2014). A mortalidade do cinamaldeído nas três  
3 maiores concentrações pode ser devido às diferentes polaridades do embrião que fazem com a  
4 que a molécula direcione sua ação conforme sua afinidade (lipofilicidade) pelas características  
5 químicas da molécula em análise (VALANCIUNAITE et al., 2020).

6 Essa alta mortalidade nas concentrações desejadas, também pode ser devido a pequenas  
7 variações na taxa de desenvolvimento dos embriões, tais como, a variação no número de  
8 embriões emergindo de seus córions no momento do tratamento (as malformações ocorrem  
9 mais frequentemente enquanto os embriões estão na fase de córion); a capacidade dos  
10 componentes do óleo de cruzar a barreira embrionária (POLEDNIK; KOCH; FELZIEN, 2018);  
11 acúmulo de sangue próximo à porção anterior do saco vitelínico, enfraquecimento dos vasos,  
12 edema pericárdico, efeitos necróticos do tecido os quais interrompem a estrutura do coração ou  
13 aumento da pressão decorrente do edema (LEE et al., 2013).

14 O teste do micronúcleo, realizado em roedores, tem sido amplamente aceito e  
15 empregado pelas agências reguladoras com a finalidade de investigar a toxicidade genética *in*  
16 *vivo* (ANVISA, 2013). Levando-se em consideração os resultados de genotoxicidade, pode-se  
17 inferir que o cinamaldeído na dose de 4 mg/Kg não possui efeito genotóxico no sistema  
18 eritroide. Entretanto, estudo prévio indicou que o cinamaldeído nas doses de 850, 1700 e 2550  
19 mg/kg é capaz de induzir formação de micronúcleo em células hepáticas (MERETO et al.,  
20 1994). A genotoxicidade do cinamaldeído também foi demonstrada pela literatura no modelo  
21 *in vitro* através do ensaio de reversão. Os autores comprovaram não ter atividade mutagênica  
22 no teste de genotoxicidade, visto que ele não interagiu com o DNA para transmitir e  
23 desencadear mutações (SEKIZAWA; SHIBAMOTO, 1982).

24 Em relação ao teste de segurança da pomada em orabase contendo cinamaldeído na  
25 mucosa ceratinizada de ratos, obtivemos um resultado e já esperado, visto que, a literatura já  
26 evidenciou a capacidade antiinflamatória do cinamaldeído (DOYLE; STEPHENS, 2019). Essa  
27 ação se dá através da indução da apoptose, inibição da proliferação celular nas respostas imunes  
28 mediadas por monócitos/macrófagos, da supressão da produção de óxido nítrico, regulação  
29 positiva dos níveis superficiais de moléculas co-estimulatórias (CD80 e CD69), receptores de  
30 reconhecimento de padrões (receptor toll-like 2 (TLR2) e receptor de complemento (CR3)  
31 (SILVA et al., 2018), além da diminuição dos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-6 (MATEEN et al., 2019).

32 Essa capacidade antiinflamatória e de regeneração também foi testada em modelo *in*  
33 *vivo*. Alguns autores testaram cinamaldeído na forma tópica e demonstraram sua capacidade de  
34 cicatrizar feridas infectadas por *Pseudomonas aeruginosa*. Isso se deu porque o cinamaldeído

1 proporcionou a indução de níveis mais baixos de interleucina-17 (IL-17), fator de crescimento  
2 endotelial vascular (VEGF) e óxido nítrico (FERRO et al., 2019). Outro estudo que avaliou a  
3 eficácia de uma pomada preparada a partir do extrato hidroetanólico de *Cinnamomum verum*,  
4 que contém 11,26 % de cinamaldeído em sua composição, mostrou que houve aceleração na  
5 cicatrização das feridas de camundongos diabéticos. Isso ocorreu devido maior proliferação de  
6 fibroblastos, deposição de colágeno, reepitelização e biossíntese de queratina (Daemi, et al.  
7 2019). Outro ponto que favoreceu a regeneração tecidual foi a indução de vasodilatação  
8 periférica através da ativação do potencial receptor transitório da anquirina - 1 (TRPA1) em  
9 camundongos (AUBDOOL et al., 2016).

10 Esta mesma pomada que foi testada em modelo animal, também foi avaliada em seres  
11 humanos através de um ensaio clínico fase I. Sua finalidade foi avaliar a segurança e  
12 tolerabilidade dessa formulação, pontuando e descrevendo detalhadamente os possíveis efeitos  
13 adversos surgidos durante o seu uso. Apesar da maioria usar a prótese de forma contínua (68%),  
14 ao comparar os exames clínicos intrabuciais, evidenciou-se que não houve o desencadeamento  
15 de sinais e sintomas de inflamação, confirmados através dos exames de citologia esfoliativa.  
16 Isso ocorreu devido a sua capacidade antiinflamatória (Doyle and Stephens, 2019), comprovada  
17 por estudos que demonstraram sua capacidade de promover diminuição dos níveis de  
18 interleucinas, fatores de necrose tumoral (Mateen et al., 2019), bem como a regulação positiva  
19 dos níveis de moléculas co-estimulatórias, tais como CD80 e CD69 (SILVA et al., 2018). Estas  
20 propriedades foram confirmadas em humanos por Araújo e colaboradores, os quais  
21 demonstraram eficácia clínica do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume, que  
22 contém cinamaldeído em sua composição, no tratamento da candidíase oral (DE ARAÚJO et  
23 al., 2021).

24 Houve uma redução em 99% das UFCs nos voluntários após o uso por 15 dias do  
25 produto. Apesar de serem participantes saudáveis, sem a presença de infecção fúngica na  
26 cavidade oral, alguns demonstraram a presença de fungo na forma comensal, visto que eles  
27 podem existir na forma comensal na cavidade oral independente da presença de estomatite  
28 (LOSTER; WIECZOREK; LOSTER, 2016). Essa redução ocorreu devido a capacidade  
29 antifúngica do cinamaldeído frente às cepas do gênero *Candida* spp. (ALVES et al., 2020;  
30 MATEEN et al., 2019) .

31 A aceitabilidade do produto é importante para a adesão do voluntário ao tratamento,  
32 pois o paciente não aderente pode ter dificuldades em manter a dosagem e com isso, sofrer  
33 exposição inadequada ao antifúngico (ZHANG et al., 2016). Cerca de 17% dos participantes  
34 relataram a presença de ardor leve e passageiro no momento da aplicação do produto na mucosa

1 oral. Não houve acréscimo de outros sintomas, tais como: queimação, alteração do paladar,  
2 prurido, descamação, eritema e alteração da cor dos dentes. Um dos possíveis efeitos adversos  
3 do cinamaldeído é a hipersensibilidade. A literatura já demonstrou casos de reações alérgicas  
4 intraorais após o uso de produtos que contiveram cinamaldeído (ISAAC-RENTON; LI;  
5 PARSONS, 2015), contudo, relatos de dermatite de contato alérgica e estomatite como  
6 resultado do uso de óleo essencial de *C. zeylanicum* são raros (YANAKIEV, 2020). Estudos *in*  
7 *vivo* relataram ausência de efeitos indesejáveis significativos no fígado, nenhuma  
8 hipersensibilidade e uma ampla faixa terapêutica de *C. zeylanicum* (YANAKIEV, 2020).

9 De uma forma geral, as características com relação ao uso de dentaduras e sintomas  
10 entre os grupos, foram homogêneas. Aproximadamente 69% eram idosos, 88% apresentaram  
11 higiene bucal favorável, 77% eram acometidos por doenças crônicas e 67% dos participantes  
12 não tinham o hábito de remover a prótese para dormir. Apesar das alterações hormonais em  
13 mulheres na menopausa facilitar o desenvolvimento de lesões de inflamação da mucosa oral  
14 (MARTORI et al., 2017), esse fator não foi imprescindível para interferir nos resultados de  
15 segurança da formulação.

16 Apesar de fatores como idade avançada (Shirazi, et al. 2019), presença de doenças  
17 crônicas (MARTORI et al., 2017; SERRANO et al., 2020), deficiências nutricionais (TELLES;  
18 KARKI; MARSHALL, 2017) e má higiene oral (ALRAYYES et al., 2019), predispuerem à  
19 alteração do ambiente e favorecerem a proliferação e transição de comensal para patogênica de  
20 *Candida* (HERTEL; SCHMIDT-WESTHAUSEN; STRIETZEL, 2016), nenhum voluntário  
21 desencadeou processos inflamatórios na mucosa oral, mesmo tendo ocorrido o acometimento  
22 de alguns desses fatores entre eles.

23 Todos os pacientes relataram sabor agradável, sem maiores desconfortos durante e/ou  
24 após o uso da formulação, confirmando uma tolerabilidade satisfatória e uma baixa toxicidade.  
25 Isso encoraja estudos futuros para avaliar os efeitos clínicos em células do tecido oral dessa  
26 formulação com pacientes que apresentarem a estomatite protética, através de um ensaio clínico  
27 fase II.

## 1 7 CONCLUSÕES

2 O cinamaldeído apresentou atividade antifúngica demonstrando capacidade em reduzir  
3 biofilme e alterar a micromorfologia fúngica. Além disso, não foi citotóxico para eritrócitos  
4 humanos, nem tóxico em modelo animal de vertebrados (exceção do peixe-zebra) e  
5 invertebrados, bem como não apresentou atividade genotóxica. Além disso, quando utilizado  
6 na forma de pomada em orabase, com reconhecida atividade antifúngica contra *Candida*  
7 *albicans*, não mostrou evidências clínicas e histológicas de processo inflamatório em mucosa  
8 de animais. Em modelo com seres humanos, a pomada em orabase contendo cinamaldeído foi  
9 segura e tolerável para ser usado no ensaio clínico fase II com a finalidade de comprovar sua  
10 eficácia no tratamento da estomatite protética.

11

## 8 REFERÊNCIAS

- ALRAYYES, S. F.; ALRUWAILI, H. M.; TAHER, I. A.; ELRAHAWY, K. M. et al. Oral *Candidal* carriage and associated risk indicators among adults in Sakaka, Saudi Arabia. **BMC Oral Health**, 19, n. 1, p. 86-86, 2019.
- ALTMEIER, S.; TOSKA, A.; SPARBER, F.; TEIJEIRA, A. et al. IL-1 coordinates the neutrophil response to *C. albicans* in the oral mucosa. **PLoS Pathogens**, 12, n. 9, p. e1005882-e1005882, 2016.
- ALVES, D. d. N.; FERREIRA, A. R.; DUARTE, A. B. S.; MELO, A. K. V. et al. Breakpoints for the Classification of *Anti-Candida* Compounds in Antifungal Screening. **BioMed Research International**, 2021, 2021.
- ALVES, L. A.; FREIRES, I. d. A.; PEREIRA, T. M.; SOUZA, A. d. et al. Effect of *Schinus terebinthifolius* on *Candida albicans* growth kinetics, cell wall formation and micromorphology. **Acta Odontologica Scandinavica**, 71, n. 3-4, p. 965-971, 2013.
- ANVISA, B. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. **Anvisa, Brasília. ALP, H**, p. 970-975, 2013.
- ARASTEHFAR, A.; CARVALHO, A.; NGUYEN, M. H.; HEDAYATI, M. T. et al. COVID-19-associated candidiasis (CAC): an underestimated complication in the absence of immunological predispositions? **Journal of Fungi**, 6, n. 4, p. 211-211, 2020.
- AUBDOOL, A. A.; KODJI, X.; ABDUL-KADER, N.; HEADS, R. et al. TRPA1 activation leads to neurogenic vasodilatation: involvement of reactive oxygen nitrogen species in addition to CGRP and NO. **British Journal Of Pharmacology**, 173, n. 15, p. 2419-2433, 2016.
- AZIZ, Z. A. A.; AHMAD, A.; SETAPAR, S. H. M.; KARAKUCUK, A. et al. Essential oils: extraction techniques, pharmaceutical and therapeutic potential-a review. **Current Drug Metabolism**, 19, n. 13, p. 1100-1110, 2018.
- BAMBINO, K.; CHU, J. Zebrafish in toxicology and environmental health. *In*: Elsevier, 2017. v. 124, p. 331-367.
- BASSOY, E. Y.; TOWNE, J. E.; GABAY, C. Regulation and function of interleukin-36 cytokines. **Immunological Reviews**, 281, n. 1, p. 169-178, 2018.
- BAYM, M.; STONE, L. K.; KISHONY, R. Multidrug evolutionary strategies to reverse antibiotic resistance. **Science**, 351, n. 6268, 2016.
- BEILMANN, M.; BOONEN, H.; CZICH, A.; DEAR, G. et al. Optimizing drug discovery by investigative toxicology: current and future trends. **Alternatives to Animal Experimentation: ALTEX**, 36, n. 2, p. 289-313, 2019.
- BENADUCCI, T.; JEC, S.; LOURENCETTI, N. M.; SCORZONI, L. et al. Virulence of *Cryptococcus* sp. Biofilms. : Vitro 2016.

- 1  
2 BERMAN, J.; KRYSAN, D. J. Drug resistance and tolerance in fungi. **Nature Reviews**  
3 **Microbiology**, 18, n. 6, p. 319-331, 2020.  
4
- 5 BIANCHI, C. M. P. d. C.; BIANCHI, H. A.; TADANO, T.; PAULA, C. R. d. et al. Factors  
6 related to oral candidiasis in elderly users and non-users of removable dental prostheses.  
7 **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 58, 2016.  
8
- 9 BUHL, A.-L.; WENZEL, J. Interleukin-36 in infectious and inflammatory skin diseases.  
10 **Frontiers In Immunology**, 10, p. 1162-1162, 2019.  
11
- 12 CAMPOS, S. C.; SILVA, C. G.; CAMPANA, P. R. V.; ALMEIDA, V. L. Toxicidade de  
13 espécies vegetais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 18, n. 1, p. 373-382, 2016.  
14
- 15 CAPLAN, T.; LORENTE-MACÍAS, Á.; STOGIOS, P. J.; EVDOKIMOVA, E. et al.  
16 Overcoming fungal echinocandin resistance through inhibition of the non-essential stress  
17 kinase Yck2. **Cell Chemical Biology**, 27, n. 3, p. 269-282, 2020.  
18
- 19 CONCEA. Diretriz da Prática de Eutanásia do CONCEA. : Conselho Nacional de Controle de  
20 Experimentação Animal. Ministério da Saúde. 2015.  
21
- 22 CUTULI, M. A.; PETRONIO PETRONIO, G.; VERGALITO, F.; MAGNIFICO, I. et al.  
23 *Galleria mellonella* as a consolidated in vivo model hosts: new developments in antibacterial  
24 strategies and novel drug testing. **Virulence**, 10, n. 1, p. 527-541, 2019.  
25
- 26 DA NÓBREGA ALVES, D.; MONTEIRO, A. F. M.; ANDRADE, P. N.; LAZARINI, J. G. et  
27 al. Docking Prediction, Antifungal Activity, Anti-Biofilm Effects on *Candida* spp., and  
28 Toxicity against Human Cells of Cinnamaldehyde. **Molecules**, 25, n. 24, p. 5969-5969, 2020.  
29
- 30 DAEMI, A.; LOTFI, M.; FARAHPOUR, M. R.; ORYAN, A. et al. Topical application of  
31 Cinnamomum hydroethanolic extract improves wound healing by enhancing re-  
32 epithelialization and keratin biosynthesis in streptozotocin-induced diabetic mice.  
33 **Pharmaceutical Biology**, 57, n. 1, p. 799-806, 2019.  
34
- 35 DE ALMEIDA FREIRES, I.; MURATA, R. M.; FURLETTI, V. F.; SARTORATTO, A. et al.  
36 *Coriandrum sativum* L.(coriander) essential oil: antifungal activity and mode of action on  
37 *Candida* spp., and molecular targets affected in human whole-genome expression. **PLoS One**,  
38 9, n. 6, p. e99086-e99086, 2014.  
39
- 40 DE ALMEIDA, M. A. L.; BATISTA, A. U. D.; DE ARAÚJO, M. R. C.; DE ALMEIDA, V. F.  
41 D. S. et al. Cinnamaldehyde is a biologically active compound for the disinfection of removable  
42 denture: blinded randomized crossover clinical study. **BMC Oral Health**, 20, n. 1, p. 1-11,  
43 2020.  
44
- 45 DE ALMEIDA ROCHELLE, S. L.; SARDI, J. d. C. O.; FREIRES, I. A.; DE CARVALHO  
46 GALVÃO, L. C. et al. The anti-biofilm potential of commonly discarded agro-industrial  
47 residues against opportunistic pathogens. **Industrial Crops and Products**, 87, p. 150-160,  
48 2016.  
49

- 1 DE ARAÚJO, M. R. C.; MACIEL, P. P.; CASTELLANO, L. R. C.; BONAN, P. R. F. et al.  
2 Efficacy of essential oil of cinnamon for the treatment of oral candidiasis: A randomized trial.  
3 **Special Care in Dentistry**, 2021.  
4
- 5 DOMÍNGUEZ-ANDRÉS, J.; ARTS, R. J. W.; TER HORST, R.; GRESNIGT, M. S. et al.  
6 Rewiring monocyte glucose metabolism via C-type lectin signaling protects against  
7 disseminated candidiasis. **PLoS Pathogens**, 13, n. 9, p. e1006632-e1006632, 2017.  
8
- 9 DOYLE, A. A.; STEPHENS, J. C. A review of cinnamaldehyde and its derivatives as  
10 antibacterial agents. **Fitoterapia**, 139, p. 104405-104405, 2019.  
11
- 12 EL-HOUSSAINI, H. H.; ELNABAWY, O. M.; NASSER, H. A.; ELKHATIB, W. F. Influence  
13 of subinhibitory antifungal concentrations on extracellular hydrolases and biofilm production  
14 by *Candida albicans* recovered from Egyptian patients. **BMC Infectious Diseases**, 19, n. 1, p.  
15 54-54, 2019.  
16
- 17 ELLEPOLA, K.; LIU, Y.; CAO, T.; KOO, H. et al. Bacterial GtfB augments *Candida albicans*  
18 accumulation in cross-kingdom biofilms. **Journal of Dental Research**, 96, n. 10, p. 1129-1135,  
19 2017.  
20
- 21 FARAG, M. R.; ALAGAWANY, M. Erythrocytes as a biological model for screening of  
22 xenobiotics toxicity. **Chemico-biological Interactions**, 279, p. 73-83, 2018.  
23
- 24 FERREIRA, G.; ROSALEN, P.; PEIXOTO, L.; PÉREZ, A. et al. Antibiofilm activity and  
25 mechanism of action of the disinfectant chloramine T on *Candida* spp., and its toxicity against  
26 human cells. **Molecules**, 22, n. 9, p. 1527-1527, 2017.  
27
- 28 FERRO, T. A. F.; SOUZA, E. B.; SUAREZ, M. A. M.; RODRIGUES, J. F. S. et al. Topical  
29 application of cinnamaldehyde promotes faster healing of skin wounds infected with  
30 *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecules**, 24, n. 8, p. 1627-1627, 2019.  
31
- 32 FINNEY, D. J. Probit analysis 3rd edition Cambridge Univ. **Press. Cambridge**, 1971.  
33
- 34 FREIRES, I. A.; SARDI, J. d. C. O.; DE CASTRO, R. D.; ROSALEN, P. L. Alternative animal  
35 and non-animal models for drug discovery and development: bonus or burden?  
36 **Pharmaceutical Research**, 34, n. 4, p. 681-686, 2017.  
37
- 38 FRENZEL, C.; TESCHKE, R. Herbal hepatotoxicity: clinical characteristics and listing  
39 compilation. **International journal of molecular sciences**, 17, n. 5, p. 588-588, 2016.  
40
- 41 FRIEDMAN, L. M.; FURBERG, C. D.; DEMETS, D. L.; REBOUSSIN, D. M. *et al.*  
42 **Fundamentals of Clinical Trials**. Springer, 2015. 331918539X.  
43
- 44 GACON, I.; LOSTER, J. E.; WIECZOREK, A. Relationship between oral hygiene and fungal  
45 growth in patients: users of an acrylic denture without signs of inflammatory process. **Clinical**  
46 **Interventions in Aging**, 14, p. 1297-1297, 2019.  
47
- 48 GAMSE, J. T.; GORELICK, D. A. Mixtures, metabolites, and mechanisms: understanding  
49 toxicology using zebrafish. **Zebrafish**, 13, n. 5, p. 377-378, 2016.  
50

- 1 GOWDER, S. J. T. Safety assessment of food flavor-cinnamaldehyde. **Biosafety**, 3, p. e147-  
2 e147, 2014.  
3
- 4 GULATI, S.; DESAI, J.; PALACKDHARRY, S. M.; MORRIS, J. C. et al. Phase 1 dose-finding  
5 study of metformin in combination with concurrent cisplatin and radiotherapy in patients with  
6 locally advanced head and neck squamous cell cancer. **Cancer**, 126, n. 2, p. 354-362, 2020.  
7
- 8 HALLARE, A. V.; KÖHLER, H. R.; TRIEBSKORN, R. Developmental toxicity and stress  
9 protein responses in zebrafish embryos after exposure to diclofenac and its solvent, DMSO.  
10 **Chemosphere**, 56, n. 7, p. 659-666, 2004.  
11
- 12 HEATH, J. E.; SCHOLZ, G. M.; VEITH, P. D.; REYNOLDS, E. C. IL-36 $\gamma$  regulates mediators  
13 of tissue homeostasis in epithelial cells. **Cytokine**, 119, p. 24-31, 2019.  
14
- 15 HERTEL, M.; SCHMIDT-WESTHAUSEN, A. M.; STRIETZEL, F.-P. Local, systemic,  
16 demographic, and health-related factors influencing pathogenic yeast spectrum and antifungal  
17 drug administration frequency in oral candidiasis: a retrospective study. **Clinical Oral**  
18 **Investigations**, 20, n. 7, p. 1477-1486, 2016.  
19
- 20 HÖFS, S.; MOGAVERO, S.; HUBE, B. Interaction of *Candida albicans* with host cells:  
21 virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. **Journal Of**  
22 **Microbiology**, 54, n. 3, p. 149-169, 2016.  
23
- 24 HOWE, K.; CLARK, M. D.; TORROJA, C. F.; TORRANCE, J. et al. The zebrafish reference  
25 genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, 496, n. 7446, p. 498-503,  
26 2013.  
27
- 28 HOYER, L. L.; COTA, E. *Candida albicans* agglutinin-like sequence (Als) family vignettes: a  
29 review of Als protein structure and function. **Frontiers In Microbiology**, 7, p. 280-280, 2016.  
30
- 31 HUANG, D. S.; LEBLANC, E. V.; SHEKHAR-GUTURJA, T.; ROBBINS, N. et al. Design  
32 and synthesis of fungal-selective resorcyolate aminopyrazole Hsp90 inhibitors. **Journal Of**  
33 **Medicinal Chemistry**, 63, n. 5, p. 2139-2180, 2019.  
34
- 35 IGNASIAK, K.; MAXWELL, A. *Galleria mellonella* (greater wax moth) larvae as a model for  
36 antibiotic susceptibility testing and acute toxicity trials. **BMC Research Notes**, 10, n. 1, p. 428-  
37 428, 2017.  
38
- 39 ISAAC-RENTON, M.; LI, M. K.; PARSONS, L. M. Cinnamon spice and everything not nice:  
40 many features of intraoral allergy to cinnamic aldehyde. **Dermatitis**, 26, n. 3, p. 116-121, 2015.  
41
- 42 JAIN, K.; VERMA, A. K.; MISHRA, P. R.; JAIN, N. K. Surface-engineered dendrimeric  
43 nanoconjugates for macrophage-targeted delivery of amphotericin B: formulation development  
44 and in vitro and in vivo evaluation. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, 59, n. 5, p.  
45 2479-2487, 2015.  
46
- 47 JENSEN, L. E. Interleukin-36 cytokines may overcome microbial immune evasion strategies  
48 that inhibit interleukin-1 family signaling. **Science Signaling**, 10, n. 492, 2017.  
49

- 1 JUVVADI, P. R.; FOX, D.; BOBAY, B. G.; HOY, M. J. et al. Harnessing calcineurin-FK506-  
2 FKBP12 crystal structures from invasive fungal pathogens to develop antifungal agents.  
3 **Nature Communications**, 10, n. 1, p. 1-18, 2019.  
4
- 5 KASMI, K. C. E. L.; STENMARK, K. R., 2015, **Contribution of metabolic reprogramming**  
6 **to macrophage plasticity and function**. Elsevier. 267-275.  
7
- 8 KATZ, L.; BALTZ, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. **Journal of**  
9 **Industrial Microbiology and Biotechnology**, 43, n. 2-3, p. 155-176, 2016.  
10
- 11 KHAN, S. N.; KHAN, S.; IQBAL, J.; KHAN, R. *et al.* Enhanced killing and antibiofilm activity  
12 of encapsulated cinnamaldehyde against *Candida albicans*. **Frontiers In Microbiology**, 8, p.  
13 1641-1641, 2017.  
14
- 15 KNUDSEN, L. E.; SMITH, A.; TÖRNQVIST, E.; FORSBY, A. et al. Nordic symposium on  
16 “toxicology and pharmacology without animal experiments—Will it be possible in the next 10  
17 years?”. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 124, n. 5, p. 560-567, 2019.  
18
- 19 KOENIG, J. A.; DAO, T. L.; KAN, R. K.; SHIH, T.-M. Zebrafish as a model for  
20 acetylcholinesterase-inhibiting organophosphorus agent exposure and oxime reactivation.  
21 **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1374, n. 1, p. 68-68, 2016.  
22
- 23 KYRIAKIDIS, I.; TRAGIANNIDIS, A.; MUNCHEN, S.; GROLL, A. H. Clinical  
24 hepatotoxicity associated with antifungal agents. **Expert Opinion On Drug Safety**, 16, n. 2, p.  
25 149-165, 2017.  
26
- 27 LAZARINI, J. G.; SARDI, J. d. C. O.; FRANCHIN, M.; NANI, B. D. et al. Bioprospection of  
28 *Eugenia brasiliensis*, a Brazilian native fruit, as a source of anti-inflammatory and antibiofilm  
29 compounds. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 102, p. 132-139, 2018.  
30
- 31 LEE, S. H.; KANG, J. W.; LIN, T.; LEE, J. E. et al. Teratogenic potential of antiepileptic drugs  
32 in the zebrafish model. **BioMed Research International**, 2013, 2013.  
33
- 34 LEE, Y.; PUUMALA, E.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Antifungal drug resistance: molecular  
35 mechanisms in *Candida albicans* and beyond. **Chemical Reviews**, 2020.  
36
- 37 LEUNG, K. C. M.; MCMILLAN, A. S.; CHEUNG, B. P. K.; LEUNG, W. K. Sjögren's  
38 syndrome sufferers have increased oral yeast levels despite regular dental care. **Oral Diseases**,  
39 14, n. 2, p. 163-173, 2008.  
40
- 41 LI, S.; XIA, M. Review of high-content screening applications in toxicology. **Archives of**  
42 **Toxicology**, 93, n. 12, p. 3387-3396, 2019.  
43
- 44 LISBOA, T.; SILVA, D.; DUARTE, S.; FERREIRA, R. et al. Toxicity and Antitumor Activity  
45 of a Thiophene–Acridine Hybrid. **Molecules**, 25, n. 1, p. 64-64, 2020.  
46
- 47 LOCKHART, S. R.; GUARNER, J. Emerging and reemerging fungal infections. 36, p. 177-  
48 181, 2019 2019.  
49

- 1 LOMBARDI, A.; OUANOUNOU, A. Fungal infections in dentistry: Clinical presentations,  
2 diagnosis, and treatment alternatives. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and**  
3 **Oral Radiology**, 2020.  
4
- 5 LOSTER, J. E.; WIECZOREK, A.; LOSTER, B. W. Correlation between age and gender in  
6 *Candida* species infections of complete denture wearers: a retrospective analysis. **Clinical**  
7 **Interventions In Aging**, 11, p. 1707-1707, 2016.  
8
- 9 MAIOR, L. d. F. S.; MACIEL, P. P.; FERREIRA, V. Y. N.; DANTAS, C. d. L. G. et al.  
10 Antifungal activity and shore a hardness of a tissue conditioner incorporated with terpinen-4-ol  
11 and cinnamaldehyde. **Clinical Oral Investigations**, 23, n. 7, p. 2837-2848, 2019.  
12
- 13 MANIK, A.; BAHL, R. A review on oral candidal infection. **Journal of Advanced Medical**  
14 **and Dental Sciences Research**, 5, n. 3, p. 54-54, 2017.  
15
- 16 MARTORI, E.; AYUSO-MONTERO, R.; WILLAERT, E.; VIÑAS, M. et al. Status of  
17 Removable Dentures and Relationship with Oral *Candida*-Associated Factors in a Geriatric  
18 Population in Catalonia. **Journal of Prosthodontics**, 26, n. 5, p. 370-375, 2017.  
19
- 20 MATEEN, S.; REHMAN, M. T.; SHAHZAD, S.; NAEEM, S. S. et al. Anti-oxidant and anti-  
21 inflammatory effects of cinnamaldehyde and eugenol on mononuclear cells of rheumatoid  
22 arthritis patients. **European Journal of Pharmacology**, 852, p. 14-24, 2019.  
23
- 24 MCGRATH, P.; LI, C.-Q. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity.  
25 **Drug Discovery Today**, 13, n. 9-10, p. 394-401, 2008.  
26
- 27 MERETO, E.; BRAMBILLA-CAMPART, G.; GHIA, M.; MARTELLI, A. et al.  
28 Cinnamaldehyde-induced micronuclei in rodent liver. **Mutation Research/Genetic**  
29 **Toxicology**, 322, n. 1, p. 1-8, 1994.  
30
- 31 MEYERS, J. R. Zebrafish: development of a vertebrate model organism. **Current Protocols**  
32 **Essential Laboratory Techniques**, 16, n. 1, p. e19-e19, 2018.  
33
- 34 MILLSOP, J. W.; FAZEL, N. Oral candidiasis. **Clinics in Dermatology**, 34, n. 4, p. 487-494,  
35 2016.  
36
- 37 MUN, M. S. S.; YAP, T.; ALNUAIMI, A. D.; ADAMS, G. G. et al. Oral candidal carriage in  
38 asymptomatic patients. **Australian Dental Journal**, 61, n. 2, p. 190-195, 2016.  
39
- 40 NAYAR, R.; WILBUR, D. C. Sistema Bethesda para Relato de Citologia Cervical: definições,  
41 critérios e notas explicativas. : São Paulo: Livromed Paulista 2018.  
42
- 43 NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly  
44 four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal Of Natural Products**, 83, n. 3, p. 770-803,  
45 2020.  
46
- 47 NIKOU, S.-A.; KICHIK, N.; BROWN, R.; PONDE, N. O. et al. *Candida albicans* interactions  
48 with mucosal surfaces during health and disease. **Pathogens**, 8, n. 2, p. 53-53, 2019.  
49

- 1 OECD, T. N. 471: bacterial reverse mutation test. **OECD Guidelines for the Testing of**  
2 **Chemicals, Section, 4, 1997.**  
3
- 4 OECD, T. N. 236: Fish embryo acute toxicity (FET) test. **OECD guidelines for the testing of**  
5 **chemicals, section, 2, p. 1-22, 2013.**  
6
- 7 OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M. et al. Métodos  
8 para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória  
9 (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 18, n. 2, p. 301-307,  
10 2008.
- 11
- 12 PAKKULNAN, R.; ANUTRAKUNCHAI, C.; KANTHAWONG, S.;  
13 TAWEECHASUPAPONG, S. et al. Extracellular DNA facilitates bacterial adhesion during  
14 *Burkholderia pseudomallei* biofilm formation. **PLoS one**, 14, n. 3, p. e0213288-e0213288, 2019.  
15
- 16 PELLON, A.; SADEGHI NASAB, S. D.; MOYES, D. L. New insights in *Candida albicans*  
17 innate immunity at the mucosa: toxins, epithelium, metabolism, and beyond. **Frontiers In**  
18 **Cellular And Infection Microbiology**, 10, p. 81-81, 2020.  
19
- 20 PERLIN, D. S.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. The  
21 global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. **The**  
22 **Lancet Infectious Diseases**, 17, n. 12, p. e383-e392, 2017.  
23
- 24 POLEDNIK, K. M.; KOCH, A. C.; FELZIEN, L. K. Effects of essential oil from *Thymus*  
25 *vulgaris* on viability and inflammation in zebrafish embryos. **Zebrafish**, 15, n. 4, p. 361-371,  
26 2018.  
27
- 28 PRASAD, R.; NAIR, R.; BANERJEE, A. Multidrug transporters of *Candida* species in clinical  
29 azole resistance. **Fungal Genetics and Biology**, 132, p. 103252-103252, 2019.  
30
- 31 REVIE, N. M.; IYER, K. R.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Antifungal drug resistance:  
32 evolution, mechanisms and impact. **Current Opinion In Microbiology**, 45, p. 70-76, 2018.  
33
- 34 ROBBINS, N.; CAPLAN, T.; COWEN, L. E. Molecular evolution of antifungal drug  
35 resistance. **Annual Review Of Microbiology**, 71, p. 753-775, 2017.  
36
- 37 SALES, G. T. M.; FORESTO, R. D. Drug-induced nephrotoxicity. **Revista da Associação**  
38 **Médica Brasileira**, 66, p. s82-s90, 2020.  
39
- 40 SARDI, J. d. C. O.; FREIRES, I. A.; LAZARINI, J. G.; INFANTE, J. et al. Unexplored endemic  
41 fruit species from Brazil: Antibiofilm properties, insights into mode of action, and systemic  
42 toxicity of four *Eugenia* spp. **Microbial Pathogenesis**, 105, p. 280-287, 2017.  
43
- 44 SEKIZAWA, J.; SHIBAMOTO, T. Genotoxicity of safrole-related chemicals in microbial test  
45 systems. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, 101, n. 2, p. 127-140, 1982.  
46
- 47 SERRANO, J.; LÓPEZ-PINTOR, R. M.; RAMÍREZ, L.; FERNÁNDEZ-CASTRO, M. et al.  
48 Risk factors related to oral candidiasis in patients with primary Sjögren's syndrome. **Medicina**  
49 **Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, 25, n. 5, p. e700-e700, 2020.  
50

- 1 SHIRAZI, J. H.; ALI, M. I.; ALGHAMDI, H. A.; FARYAL, R. et al. Pediatric oropharyngeal  
2 candidiasis: A comprehensive study on risk factors and most prevalent species of *Candida*.  
3 **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, 32, 2019.
- 4  
5 SHREAZ, S.; WANI, W. A.; BEHBEHANI, J. M.; RAJA, V. et al. Cinnamaldehyde and its  
6 derivatives, a novel class of antifungal agents. **Fitoterapia**, 112, p. 116-131, 2016.
- 7  
8 SILVA, C. S.; FIGUEIREDO, S.; DE OLIVEIRA, P. V.; DE SILVA SAMINEZ, W. F. et al.  
9 Óleo essencial da Canela (Cinamaldeído) e suas aplicações biológicas. **Revista de**  
10 **Investigação Biomédica**, 9, n. 2, p. 192-197, 2018.
- 11  
12 SILVA, T. M.; BOLZAN, T. C. A.; ZANINI, M. S.; ALENCAR, T. et al. Development and  
13 Evaluation of a Novel Oral Mucoadhesive Ointment Containing Pomegranate Peel Extract as  
14 an Adjuvant for Oral Hygiene of Dogs. **Journal of Veterinary Dentistry**, 37, n. 3, p. 133-140,  
15 2020.
- 16  
17 SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. et al.  
18 **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Artmed Editora, 2016. 8582713657.
- 19  
20 SISON-YOUNG, R. L.; LAUSCHKE, V. M.; JOHANN, E.; ALEXANDRE, E. et al. A  
21 multicenter assessment of single-cell models aligned to standard measures of cell health for  
22 prediction of acute hepatotoxicity. **Archives of toxicology**, 91, n. 3, p. 1385-1400, 2017.
- 23  
24 SKOWRON, K.; WIKTORCZYK, N.; GRUDLEWSKA, K.; KWIECIŃSKA-PIRÓG, J. et al.  
25 Drug-susceptibility, biofilm-forming ability and biofilm survival on stainless steel of *Listeria*  
26 spp. strains isolated from cheese. **International journal of food microbiology**, 296, p. 75-82,  
27 2019.
- 28  
29 SOARES, J. C.; ROSALEN, P. L.; LAZARINI, J. G.; MASSARIOLI, A. P. et al.  
30 Comprehensive characterization of bioactive phenols from new Brazilian superfruits by LC-  
31 ESI-QTOF-MS, and their ROS and RNS scavenging effects and anti-inflammatory activity.  
32 **Food chemistry**, 281, p. 178-188, 2019.
- 33  
34 SOMMER, S.; BURACZEWSKA, I.; KRUSZEWSKI, M. Micronucleus assay: The state of  
35 art, and future directions. **International Journal of Molecular Sciences**, 21, n. 4, p. 1534-  
36 1534, 2020.
- 37  
38 SPITZER, M.; ROBBINS, N.; WRIGHT, G. D. Combinatorial strategies for combating  
39 invasive fungal infections. **Virulence**, 8, n. 2, p. 169-185, 2017.
- 40  
41 STRICKLAND, A. B.; SHI, M. Mechanisms of fungal dissemination. **Cellular and Molecular**  
42 **Life Sciences**, p. 1-20, 2021.
- 43  
44 SULEYMAN, G.; ALANGADEN, G. J. Nosocomial fungal infections: epidemiology, infection  
45 control, and prevention. **Infectious Disease Clinics of North America**, 30, n. 4, p. 1023-1052,  
46 2016.
- 47  
48 SUWALSKY, M.; VARGAS, P.; AVELLO, M.; VILLENA, F. et al. Human erythrocytes are  
49 affected in vitro by flavonoids of *Aristolelia chilensis* (Maqui) leaves. **International Journal**  
50 **of Pharmaceutics**, 363, n. 1-2, p. 85-90, 2008.

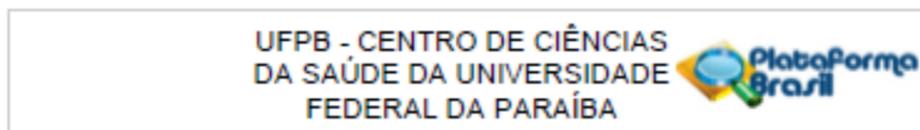
- 1  
2 SWINDELL, W. R.; BEAMER, M. A.; SARKAR, M. K.; LOFTUS, S. et al. RNA-Seq analysis  
3 of IL-1B and IL-36 responses in epidermal keratinocytes identifies a shared MyD88-dependent  
4 gene signature. **Frontiers In Immunology**, 9, p. 80-80, 2018.  
5
- 6 TARIQ, S.; WANI, S.; RASOOL, W.; SHAFI, K. et al. A comprehensive review of the  
7 antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents  
8 against drug-resistant microbial pathogens. **Microbial Pathogenesis**, 134, p. 103580-103580,  
9 2019.  
10
- 11 TELLES, D. R.; KARKI, N.; MARSHALL, M. W. Oral fungal infections: diagnosis and  
12 management. **Dental Clinics**, 61, n. 2, p. 319-349, 2017.  
13
- 14 TOBÓLSKA, S.; TERPIŁOWSKA, S.; JAROSZEWSKI, J.; SIWICKI, A. K. Genotoxicity and  
15 mutagenicity of inosine pranobex. **Journal Of Veterinary Research**, 62, n. 2, p. 207-207,  
16 2018.  
17
- 18 TRAVEN, A.; NADERER, T. Central metabolic interactions of immune cells and microbes:  
19 prospects for defeating infections. **EMBO reports**, 20, n. 7, p. e47995-e47995, 2019.  
20
- 21 VALANCIUNAITE, J.; KEMPF, E.; SEKI, H.; DANYLCHUK, D. I. et al. Polarity mapping  
22 of cells and embryos by improved fluorescent solvatochromic pyrene probe. **Analytical**  
23 **Chemistry**, 92, n. 9, p. 6512-6520, 2020.  
24
- 25 VAN DAELE, R.; SPRIET, I.; WAUTERS, J.; MAERTENS, J. et al. Antifungal drugs: What  
26 brings the future? **Medical Mycology**, 57, n. Supplement\_3, p. S328-S343, 2019.  
27
- 28 VERMA, A. H.; RICHARDSON, J. P.; ZHOU, C.; COLEMAN, B. M. et al. Oral epithelial  
29 cells orchestrate innate type 17 responses to *Candida albicans* through the virulence factor  
30 candidalysin. **Science Immunology**, 2, n. 17, 2017.  
31
- 32 WALL, G.; MONTELONGO-JAUREGUI, D.; BONIFACIO, B. V.; LOPEZ-RIBOT, J. L. et  
33 al. *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. **Current**  
34 **Opinion In Microbiology**, 52, p. 1-6, 2019.  
35
- 36 WHITESELL, L.; ROBBINS, N.; HUANG, D. S.; MCLELLAN, C. A. et al. Structural basis  
37 for species-selective targeting of Hsp90 in a pathogenic fungus. **Nature Cmmunications**, 10,  
38 n. 1, p. 1-17, 2019.  
39
- 40 WIEDERHOLD, N. P. The antifungal arsenal: alternative drugs and future targets.  
41 **International Journal of Antimicrobial Agents**, 51, n. 3, p. 333-339, 2018.  
42
- 43 WRIGHT, G. D. Opportunities for natural products in 21 st century antibiotic discovery.  
44 **Natural product reports**, 34, n. 7, p. 694-701, 2017.  
45
- 46 YADAV, A. S.; KOLLURI, G.; GOPI, M.; KARTHIK, K. et al. Exploring alternatives to  
47 antibiotics as health promoting agents in poultry-A review. **J Exp Biol**, 4, n. 3S-10.18006, p.  
48 3S-3S, 2016.  
49

- 1 YANAKIEV, S. Effects of cinnamon (*Cinnamomum* spp.) in dentistry: A review. **Molecules**,
- 2 25, n. 18, p. 4184-4184, 2020.
- 3
- 4 ZHANG, L. W.; FU, J. Y.; HUA, H.; YAN, Z. M. Efficacy and safety of miconazole for oral
- 5 candidiasis: a systematic review and meta-analysis. **Oral Diseases**, 22, n. 3, p. 185-195, 2016.
- 6

*Anexos*

## ANEXOS

ANEXO 1 – Parecer consubstanciado da Comissão de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde (CEP/CCS).



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** EFICÁCIA E SEGURANÇA DO CINAMALDEÍDO NO TRATAMENTO DA CANDÍASE BUCAL ASSOCIADA AO USO DE PRÓTESE DENTÁRIA: ENSAIO CLÍNICO, RANDOMIZADO, CONTROLADO E CEGO.

**Pesquisador:** DANIELLE DA NOBREGA ALVES

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 97363018.5.0000.5188

**Instituição Proponente:** Universidade Federal da Paraíba

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.892.294

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

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

ANEXO 2 – Pedido de patente depositado no Instituto Nacional da Propriedade Intelectual (INPI)



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA  
REITORIA  
AGÊNCIA UFPB DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA  
NÚCLEO DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA – REDE NIT-NE



**DECLARAÇÃO - Nº 232**

Declaro para fins comprobatórios que **DANIELLE DA NÓBREGA ALVES (062.723.834-36)** depositou, no dia 02/12/2019, por meio desta Agência UFPB de Inovação Tecnológica, o pedido de patente de invenção denominado **"POMADA EM ORABASE ANTIFÚNGICA PARA TRATAMENTO DE ESTOMATITE PROTÉTICA"** (BR102019025510-2). Valendo destacar que o referido pedido de patente está em sigilo de 18 (dezoito) meses a partir da data do depósito, conforme o artigo 30 da Lei Nº 9.279, de 14 de maio de 1996.

João Pessoa – PB, 05 de abril de 2021.

Hilton Viana M. C. Fialho  
Tecnólogo em Gestão Pública  
INOVA - UFPB / SAPE Nº 1205912

## ANEXO 3 - Certidão de aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



Universidade  
Federal da  
Paraíba



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da toxicidade, eficácia e segurança do cinnamaldeído em um modelo in vivo", protocolada sob o CEUA nº 2342111119 (000054), sob a responsabilidade de **Ricardo Dias de Castro** e equipe: **Danielle da Nóbrega Alves**; **Davi Felipe Farias** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 15/05/2020.

We certify that the proposal "Evaluation of cinnamaldehyde toxicity, efficacy and safety in an in vivo model", utilizing 112 Heterogenic rats (112 males), 48 Heterogenic mice (48 males), 240 Fishes (males and females), protocol number CEUA 2342111119 (000054), under the responsibility of **Ricardo Dias de Castro** and team: **Danielle da Nóbrega Alves**; **Davi Felipe Farias** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 05/15/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **08/2020** a **11/2021**

Área: **Ciências Farmacéuticas**

Origem:	Unidade de Produção Animal IpeFarM			
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo:	Machos	Idade: 90 a 100 dias
Linhagem:	Rattus Norvegicus - Wistar			N: 112
				Peso: 250 a 300 g
Origem:	Unidade de Produção Animal IpeFarM			
Espécie:	Camundongos heterogênicos	sexo:	Machos	Idade: 5 a 6 semanas
Linhagem:	Mus musculus - Swiss			N: 48
				Peso: 25 a 35 g
Origem:	Unidade de Produção de Organismos Modelo Não Convencionais (UnIPOM)			
Espécie:	Peixes	sexo:	Machos e Fêmeas	Idade: 1 a 3 horas
Linhagem:	Danio rerio			N: 240
				Peso: 0 a 0 g

Local do experimento: Os experimentos com os ratos e camundongos serão realizados no Laboratório de Psicofarmacologia/IpeFarM/UFPB; Os experimentos com os peixes serão realizados no laboratório de avaliação de riscos de novas tecnologias que divide infra-estrutura com a UnIPOM.

João Pessoa, 01 de abril de 2021

Prof. Dra. Jailane de Souza Aquino  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Carlos Augusto Alanis Clemente  
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal da Paraíba