



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

**DAVID HENRIQUE XAVIER BARBOSA**

**Produção de hidrogel contendo óleo essencial de *Coriandrum sativum* L. (coentro) com efeito sobre *Candida albicans* envolvida com infecções da cavidade bucal**

**João Pessoa – PB**

**2023**

**DAVID HENRIQUE XAVIER BARBOSA**

**Produção de hidrogel contendo óleo essencial de *Coriandrum sativum* L. (coentro) com efeito sobre *Candida albicans* envolvida com infecções da cavidade bucal**

Dissertação 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 mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, área de concentração: Farmacologia.

**ORIENTADOR:**

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

**João Pessoa – PB**

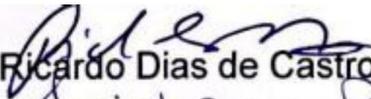
**2023**

DAVID HENRIQUE XAVIER BARBOSA

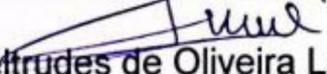
**Produção de hidrogel contendo óleo essencial de *Coriandrum sativum* L. (coentro) com efeito sobre *Candida albicans* envolvida com infecções da cavidade bucal**

APROVADA EM 23/02/2023

COMISSÃO EXAMINADORA

  
Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro (Orientador)

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Jozinete Vieira Pereira (Examinadora)

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Edeltrudes de Oliveira Lima (Examinadora)

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

B238p Barbosa, David Henrique Xavier.

Produção de hidrogel contendo óleo essencial de coriandrum sativum L. (coentro) com efeito sobre candida albicans envolvida com infecções da cavidade bucal / David Henrique Xavier Barbosa. - João Pessoa, 2023.

93 f. : il.

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

1. Candidíase bucal. 2. Antifúngicos - Oral. 3. Farmacologia. I. Castro, Ricardo Dias de. II. Título.

UFPB/BC

CDU 616.934(043)

A Deus e minha família, sobretudo, meu pai Tião (*in memoriam*) por todo suporte e carinho, minhas referências em amor, cuidado, doação, sempre responsáveis pela minha educação desde criança e por viabilizar a realização desse sonho: tornar-se mestre.

## AGRADECIMENTOS

Deus foi meu sustento até aqui, por isso, a primeira frase de agradecimento é para expressar minha gratidão a Deus, Nossa Senhora de Fátima por sempre ouvir minhas orações, desde os momentos de seleção para ingresso no mestrado até as incertezas que cercaram a trajetória do curso.

Agradeço também a minha base de sustentação, minhas referências de vida, minha amada e abençoada família, sobretudo, meu pai Tião (*in memoriam*), que sempre me ajudaram com amizade, amor, carinho, recursos e deram-me uma educação baseada na ética e no respeito e por viabilizarem a realização do curso de mestrado, além de sempre me orientarem que a educação é a única maneira de transpor barreiras sociais e ter um futuro de sucesso pautado na honestidade e melhorar a vida das pessoas ao meu redor. Expresso meus agradecimentos:

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro, que acreditou em mim e me deu a oportunidade de vivenciar a experiência de imersão em pesquisa desde a iniciação científica até o mestrado, através de orientações bastante pertinentes e colaborações para o desenvolvimento desta pesquisa. Gratidão pela compreensão enquanto ser humano e orientador diante das situações que vivenciei durante o mestrado, principalmente sua paciência nos momentos em que estive ausente cuidando do meu pai.

Aos professores do curso de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, por todo o suporte científico necessário para a formação de um Mestre em Farmacologia e também para o coordenador Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva e para a secretária Caroline Manguiera por sempre serem prestativos na disponibilização de recursos para a realização desta pesquisa e orientações administrativas e funcionários do prédio do Laboratório de Psicofarmacologia por sempre serem prestativos e acolherem os alunos. Ao Laboratório de Patologia, especialmente, prof. Adriano, Rubéns e Mayara pela ajuda na condução das análises histopatológicas.

Aos meus amigos do Laboratório de Farmacologia Experimental e Cultivo Celular (LAFECC), especialmente, para Paula, Vitória, Quemuel, Rebeca Tibau, Tereza, Prof<sup>a</sup> Gisely, Gleicy e Paloma, pela cooperação e empenho em me auxiliar e colaborar na realização dos ensaios laboratoriais.

Às Doutoradas Danielle da Nóbrega e Patrícia Nérís por serem minhas

inspirações científicas, sempre prestativas a sanarem dúvidas e auxiliarem na realização das pesquisas com esmero, cuidado e paciência para desenvolver as metodologias em conjunto comigo.

Aos meus amigos especiais, Marta Marte, Rosyelle, Ramísio, Viviane, Carol, Jessielly, Camila Borba, Helenlucy, Dona Júlia Mendes, Pollyanne, Kryscia, Rebecca Tolentino e Hais, pela força, ajuda motivacional, além de todo o incentivo através de ligações, conselhos, nos tornando pessoas melhores e sempre disponíveis para colaborar com o andamento da pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela disponibilização da bolsa que viabilizou minha dedicação total à pesquisa e pelos recursos financeiros de fomento à pesquisa. Além disso, agradeço à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ-PB) por garantir insumos para compra de reagentes de laboratório e materiais de consumo para a realização desta pesquisa e a Universidade Federal da Paraíba (UFPB), local que me acolheu há 7 anos e dispõe de uma infra-estrutura de ponta para realização de ensaios biológicos e estudos valorizados pelo mundo.

Aos membros da comissão examinadora formada pelos professores: Ricardo, Edeltrudes, Josinete pela disponibilidade em participar da avaliação dessa dissertação e pela colaboração através de observações assertivas que possibilitaram aprimorar esta pesquisa.

Enfim, aos que não foram mencionados, mas que colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho, meu muito obrigado e minha eterna gratidão por participarem dessa etapa crucial de minha vida.

BARBOSA, D. H. X. **Produção de hidrogel contendo óleo essencial de *Coriandrum sativum* L. (coentro) com efeito sobre *Candida albicans* envolvida com infecções da cavidade bucal.** 2023. 95f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – UFPB/CCS, João Pessoa.

## RESUMO

**Objetivo:** Produzir um hidrogel contendo óleo essencial (OE) de *C. sativum* L. e avaliar o efeito antifúngico sobre *Candida* spp. envolvidas com infecções da cavidade bucal, bem como, verificar o perfil toxicológico deste produto. **Métodos:** A composição química do OE de *C. sativum* L. foi identificada por Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massas, além disso, verificou-se a incorporação do OE ao hidrogel por Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier. Já no tocante aos ensaios *in vitro*, avaliou-se a atividade antifúngica do hidrogel contendo OE por meio do teste de susceptibilidade fúngica, bem como verificou-se a capacidade do OE em reduzir a atividade metabólica de biofilme multiespécie bucal. Também avaliou-se a interferência do óleo essencial de *C. sativum* L. sobre a micromorfologia fúngica. Em relação ao perfil toxicológico do OE, realizou-se o teste de citotoxicidade em eritrócitos humanos provenientes de sangue periférico humano e citotoxicidade em queratinócitos da linhagem HaCaT pelo método MTT. No que concerne aos ensaios *in vivo*, realizou-se a avaliação de genotoxicidade em teste de eritrócitos micronucleados de sangue periférico de camundongos e avaliação da toxicidade em mucosa oral ceratinizada de ratos. **Resultados:** Os componentes majoritários característicos deste OE foram descritos, tais como: 2-decen-1-ol (22.42%), dec-(2E)-enal (19.31%) e 1,6-octadien-3-ol (13.41%). Além disso, notou-se a incorporação sugerida por perpetuação de bandas do OE e interação do OE com moléculas do hidrogel com mudança de intensidade de bandas. No que se refere aos ensaios *in vitro*, o hidrogel em concentração de 20 mg/mL foi capaz de formar halo de inibição acima de 28mm. Este OE na concentração de 1600 µg/mL também apresentou capacidade de reduzir a atividade metabólica de biofilme multiespécie bucal em 37% ( $p < 0.0001$ ). Outrossim, o OE em concentrações referentes à Concentração Inibitória Mínima (CIM) (62.5 µg/mL) e CIMx2 (125 µg/mL) foi capaz de reduzir a frequência de pseudo-hifas e modificar a estrutura de blastoconídios. Acerca da toxicidade relativa à atividade hemolítica do OE apontou-se uma  $CH_{50}$  superior a CIMx4 (250 µg/mL). Ademais, o OE em concentrações de 150 e 300 µg/mL causa inibição da viabilidade celular de queratinócitos e sua  $IC_{50}$  foi de  $60.13 \pm 2.02$  µg/mL. No que toca à genotoxicidade, o tratamento em dose única de 20 mg/mL (5 mg/kg) de OE de *C. sativum* L. não estimulou o aumento do número de micronúcleos ( $16.40 \pm 1.1$ ). Por fim, a formulação se mostrou segura para uso em mucosa ceratinizada de ratos em concentração de 20 mg/mL. **Conclusões:** O OE de *C. sativum* L. apresentou constituintes químicos característicos e foi incorporado ao hidrogel com sucesso, apresentou atividade antifúngica vista em halo de inibição e alterações morfológicas em *Candida albicans*, além de reduzir a atividade metabólica de biofilme multiespécie bucal. Ademais, se demonstrou citotóxico para eritrócitos humanos, contudo foi tolerável para células de queratinócitos HaCaT e não foi genotóxico em teste com camundongos, bem como, é seguro para uso em mucosa oral ceratinizada de ratos. Esses resultados viabilizarão a realização de um ensaio clínico de fase I e II com o propósito de disponibilizar essa opção terapêutica no tratamento de infecções fúngicas.

**Palavras-chave:** Candidíase bucal; antifúngicos; toxicologia; *Coriandrum*.

BARBOSA, D. H. X. **Hydrogel production containing essential oil of *Coriandrum sativum* L. (coriander) with effect on *Candida albicans* involved with infections of the oral cavity.** 2023. 95f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – UFPB/CCS, João Pessoa.

## ABSTRACT

**Objective:** To produce a hydrogel containing essential oil (EO) from *C. sativum* L. and to evaluate the antifungal effect on *Candida* spp. involved with oral cavity infections, as well as verify the toxicological profile of this product. **Methods:** The chemical composition of the EO of *C. sativum* L. was identified by Gas Chromatography Coupled to the Mass Spectrometer, in addition, the incorporation of the EO to the hydrogel was verified by Infrared Spectroscopy by Fourier transform. Regarding the *in vitro* assays, the antifungal activity of the hydrogel containing EO was evaluated through the fungal susceptibility test, as well as the ability of the EO to reduce the metabolic activity of the buccal multispecies biofilm. The interference of the essential oil of *C. sativum* L. on the fungal micromorphology was also evaluated. Regarding the toxicological profile of the EO, the cytotoxicity test was carried out in human erythrocytes from human peripheral blood and cytotoxicity in keratinocytes of the HaCaT lineage by the MTT method. With regard to *in vivo* assays, an evaluation of genotoxicity was carried out in a test of micronucleated erythrocytes from peripheral blood of mice and an evaluation of toxicity in keratinized oral mucosa of rats. **Results:** The major components characteristic of this EO were described, such as: 2-decen-1-ol (22.42%), dec-(2E)-enal (19.31%) and 1,6-octadien-3-ol (13.41%). In addition, the incorporation suggested by perpetuation of EO bands and interaction of EO with hydrogel molecules with change in band intensity was noted. With regard to *in vitro* assays, the hydrogel at a concentration of 20 mg/mL was able to form an inhibition halo above 28 mm. This EO at a concentration of 1600 µg/mL also showed the ability to reduce the metabolic activity of oral multispecies biofilm by 37% ( $p < 0.0001$ ). Furthermore, EO at concentrations related to Minimum Inhibitory Concentration (MIC) (62.5 µg/mL) and MICx2 (125 µg/mL) was able to reduce the frequency of pseudohyphae and modify the structure of blastoconidia. Regarding the toxicity related to the hemolytic activity of the EO, a CH<sub>50</sub> higher than MICx4 (250 µg/mL) was pointed out. Furthermore, EO at concentrations of 150 and 300 µg/mL causes inhibition of keratinocyte cell viability and its IC<sub>50</sub> was 60.13 ± 2.02 µg/mL. With regard to genotoxicity, treatment with a single dose of 20 mg/mL (5 mg/kg) of EO of *C. sativum* L. did not stimulate an increase in the number of micronuclei (16.40 ± 1.1). Finally, the formulation proved to be safe for use in keratinized mucosa of rats at a concentration of 20 mg/mL. **Conclusions:** The EO from *C. sativum* L. showed characteristic chemical constituents and was successfully incorporated into the hydrogel, showed antifungal activity seen in an inhibition halo and morphological changes in *Candida albicans*, in addition to reducing the metabolic activity of an oral multispecies biofilm. Furthermore, it was shown to be cytotoxic for human erythrocytes, however it was tolerable for HaCaT keratinocyte cells and was not genotoxic in a test with mice, as well as it is safe for use in keratinized oral mucosa of rats. These results will make it possible to carry out a phase I and II clinical trial with the purpose of making this therapeutic option available in the treatment of fungal infections.

**Keywords:** Oral candidiasis; antifungals; toxicology; *Coriandrum*.

## ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs – Absorbância  
ALS – Proteína de sequência semelhante a aglutininas  
AMPc – Adenosina monofosfato cíclico  
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
APS – Aspartil Protease secretada  
ASD - Ágar Sabouraud Dextrose  
ATCC - American Type Culture Collection / Coleção de cultura tipográfica americana  
BCR1 – Gene regulador de biofilme e parede celular  
CEUA - Comissão de Ética para Uso Animal  
CFM – Concentração Fungicida Mínima  
CG-EM – Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas  
CH<sub>50</sub> – concentração que produz 50% de hemólise de eritrócitos  
CHX – Clorexidina  
CIM – Concentração Inibitória Mínima  
Cl<sup>-</sup> - íon cloreto  
CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono  
CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal  
CSD – Caldo Sabouraud Dextrose  
DMEM - meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium  
DMSO – Dimetilsulfóxido  
DNA - Ácido desoxirribonucleico  
DP – Desvio padrão  
Erg – Ergosterol  
FDA – Food and Drug Administration  
FTIR - Infravermelho por transformada de Fourier  
H<sup>+</sup> - íon hidrogênio  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de Hidrogênio  
HaCaT - Queratinócitos Humanos Adultos com Baixo Teor de Cálcio e Alta Temperatura  
HCl – Ácido clorídrico  
HIV - Vírus da imunodeficiência humana  
HWP-1 - Proteína da parede da hifa  
IC<sub>50</sub> – Concentração que inibe 50% das células  
INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial  
K<sup>+</sup> - íon Potássio  
KBr – Brometo de Potássio  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – Fosfato monopotássico  
MTT - brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio  
Na<sup>+</sup> - íon sódio  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – Fosfato dissódico  
NaCl – Cloreto de sódio

NIST – Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia  
OE – óleo essencial  
OECD - Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico  
PBS - Salina tamponada com fosfato  
pH - Potencial hidrogeniônico  
ppm – Partes por milhão  
ROS – Espécies reativas de oxigênio  
RPH – Reconhecimento dos padrões de hospedeiro  
*S. mitis* – *Streptococcus mitis*  
*S. sanguinis* – *Streptococcus sanguinis*  
SDS - Dodecil Sulfato de Sódio  
SSA1 – forma citosólica da subfamília da proteína de choque térmico  
TGI – Inibição total do crescimento  
TPHP - 1,3,5-trifenil formazan  
Tr – Tempo de retenção  
TTC - Cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio  
UFC – Unidade Formadora de Colônia

## LISTA DE FIGURAS

Página

<b>Figura 1.</b> Aspectos morfológicos da forma filamentosa de um fungo do gênero <i>Candida</i> , evidenciando a presença de blastoconídios, pseudo-hifas e clamideoconídios.....	26
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática da estrutura celular de um fungo, dando destaque a parede celular e membrana celular fúngica.....	27
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática sobre a classificação dos tipos de candidíase oral.....	30
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática do mecanismo de ação da anfotericina B, pertencente a classe dos polienos.....	33
<b>Figura 5.</b> Representação esquemática do mecanismo de ação do fluconazol, pertencente a classe dos azóis.....	33
<b>Figura 6.</b> Representação esquemática do mecanismo de ação da caspofungina, pertencente a classe das equinocandinas.....	34
<b>Figura 7.</b> Folhas de <i>Coriandrum sativum</i> L. (coentro).....	36
<b>Figura 8.</b> Esquematização das etapas gerais contempladas no estudo.....	42
<b>Figura 9.</b> Cromatograma do OE de <i>C. sativum</i> L. identificados por cromatografia gasosa (CG-EM) no ano de 2019.....	55
<b>Figura 10.</b> Cromatograma do OE de <i>C. sativum</i> L. identificados por cromatografia gasosa (CG-EM) no ano de 2022.....	56
<b>Figura 11.</b> Espectros FTIR das amostras de óleo essencial de <i>Coriandrum sativum</i> L., hidrogel e óleo essencial de <i>C. sativum</i> L. incorporado ao hidrogel.....	57
<b>Figura 12.</b> Espectros FTIR das amostras de óleo essencial de <i>C. sativum</i> L. incorporado ao hidrogel.....	58
<b>Figura 13.</b> Gráfico que representa a média $\pm$ DP de três experimentos independentes realizados em triplicata. Trata-se de um gráfico que fornece o diâmetro da zona de inibição em função da concentração de hidrogel contendo OE de <i>C. sativum</i> L. testada (mg/mL). ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey que foi realizada para comparação entre os grupos, **** $p < 0,0001$ , ** $p < 0,01$ em relação ao controle positivo (miconazol).....	59
<b>Figura 14.</b> Imagem da aferição do diâmetro de halo de inibição dos hidrogéis contendo	

óleo essencial (OE) de *Coriandrum sativum* L. e miconazol por paquímetro digital. \*a (hidrogel na concentração de 1 mg/mL de OE); \*b (hidrogel na concentração de 2 mg/mL de OE); \*c (hidrogel na concentração de 10 mg/mL de OE); \*d (hidrogel na concentração de 20 mg/mL de OE); \*c+ (controle positivo – miconazol gel oral 20 mg/g).....60

**Figura 15.** Atividade metabólica do biofilme multiespécie bucal tratados com óleo essencial de *Coriandrum sativum* L. nas concentrações de 1600, 800 e 400 µg/mL, clorexidina 0.12% e meio de cultura (controle). O biofilme que corresponde ao controle foi considerado com 100% de atividade metabólica. Os resultados são apresentados como média ± DP de três experimentos independentes realizados em triplicata (ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey, \*\*\*\* p<0.0001; \*p=0.0291 em comparação com o grupo controle)..... 61

**Figura 16.** Imagens representativas de grupos experimentais que contemplam o efeito do OE de *C. sativum* L. e da nistatina na micromorfologia de *Candida albicans* ATCC 90028. 15A e 15B controle negativo; 15C tratamento com óleo essencial de *C. sativum* L. a 62.5 µg/mL (CIM); 15D tratamento com nistatina a 1.5 µg/mL (CIM); 15E tratamento com óleo essencial de *C. sativum* L. a 125 µg/mL (CIMx2); 15F tratamento com nistatina a 3 µg/mL (CIMx2); a. blastoconídios. b. pseudo-hifas.c.clamidioconídios.Bar:50µm(400x)..... 63

**Figura 17.** Possíveis efeitos citotóxicos do OE de *C. sativum* L. contra os eritrócitos humanos com tipo sanguíneo A-, B+, AB+ e O+. Essas amostras de diferentes tipos sanguíneos foram incubadas em diferentes concentrações do óleo essencial de *C. sativum* L. (62,5 – 1000 µg/mL) durante 1h a 37°C, determinando a atividade hemolítica por método colorimétrico. Os gráficos acima representam a média ± DP de três experimentos independentes realizados em duplicata (Oneway ANOVA seguido do pós-teste de Tukey para comparação entre os grupos, sendo \*\*\*\* p<0.0001). Controle positivo (água Milli Q) e Controle negativo (solução tamponada de PBS)..... 64

**Figura 18.** Efeitos do óleo essencial de *C. sativum* L. (4,5 – 300 µg/mL) e DXR\* (0,312 – 20 µM) em diferentes concentrações na viabilidade de células não tumorais HaCat após 72 horas de tratamento. Os resultados são expressos como média ± erro padrão de três experimentos independentes realizados em quadruplicata, testados em diferentes concentrações (µM e µg/mL). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey. <sup>a</sup>p <0,05 em relação ao controle não

tratado.....	65
<b>Figura 19.</b> Efeito da administração em dose única do óleo essencial de <i>C. sativum</i> L. (20 mg/mL) e ciclofosfamida (50 mg/kg) no número de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos após 48h de tratamento.....	67
<b>Figura 20.</b> Corte histológico do palato duro corado em hematoxilina e eosina evidenciado aspectos de normalidade em todas as condições experimentais. A. Grupo Controle negativo (solução salina). B. Grupo hidrogel sem OE. C. Hidrogel contendo OE de <i>C. sativum</i> L. na concentração de 20mg/mL. Legendas: Ep. Epiderme. Dm. Derme. Aumento total de 400x.....	68

## LISTA DE TABELAS

### Página

<b>Tabela 1.</b> Constituintes químicos presentes no OE de <i>C. sativum</i> L. identificados por cromatografia gasosa (CG-EM) nos anos de 2019 e 2022.....	54
<b>Tabela 2.</b> Atividade citotóxica do óleo essencial de <i>C. sativum</i> L. e doxorrubicina contra a linhagem celular HaCaT.....	66
<b>Tabela 3.</b> Efeito da administração em dose única do óleo essencial de <i>C. sativum</i> L. (20 mg/mL) e ciclofosfamida (50 mg/kg) no número de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos após 48h de tratamento.....	67

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	23
2.1 Objetivo Geral .....	23
2.2 Objetivos Específicos.....	23
<b>3. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	25
3.1 Gênero <i>Candida</i> e suas características .....	25
3.2 Considerações clínicas e tipos de Candidíase oral.....	29
3.3 Tratamento farmacológico das infecções fúngicas .....	32
3.4 Plantas medicinais e <i>Coriandrum sativum</i> L. ....	35
3.5 Estudos toxicológicos na prospecção de produtos naturais .....	38
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	42
4.1 Etapas gerais do estudo.....	42
4.2 Locais da pesquisa.....	43
4.3 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de massas .....	43
4.4 Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier .....	44
4.5 Ensaio <i>in vitro</i> .....	44
4.5.1 Teste de susceptibilidade fúngica .....	44
4.5.2 Estudo do efeito do óleo essencial de <i>C. sativum</i> L. sobre a redução de biofilme multiespécie bucal.....	45
4.5.3 Estudo do efeito do óleo essencial de <i>C. sativum</i> L. sobre a micromorfologia de cepas de <i>C. albicans</i> .....	47
4.5.4 Citotoxicidade em eritrócitos humanos .....	47
4.5.5 Ensaio de citotoxicidade sobre queratinócitos humanos .....	48
4.6 Ensaio <i>in vivo</i> .....	49
4.6.1 Animais e comitê de ética .....	49
4.6.2 Genotoxicidade .....	50
4.6.3 Estudo de toxicidade em mucosa oral ceratinizada de ratos ...	51
4.7 Análise estatística.....	53

<b>5. RESULTADOS</b> .....	54
5.1 Análise fitoquímica do óleo essencial de <i>C. sativum</i> L. ....	54
5.2 Análise por infravermelho do hidrogel contendo óleo essencial de <i>C. sativum</i> L. ....	56
5.3 Ensaio <i>in vitro</i> .....	58
5.3.1 Teste de susceptibilidade fúngica .....	58
5.3.2 Estudo do efeito do óleo essencial de <i>C. sativum</i> L. sobre a redução de biofilme multiespécie .....	60
5.3.3 Estudo do efeito do óleo essencial de <i>C. sativum</i> L. sobre a micromorfologia de cepas de <i>C. albicans</i> .....	61
5.3.4 Citotoxicidade em eritrócitos humanos .....	64
5.3.5 Ensaio de citotoxicidade sobre queratinócitos humanos .....	65
5.4 Ensaio <i>in vivo</i> .....	66
5.4.1 Genotoxicidade .....	66
5.4.2 Estudo de toxicidade em mucosa oral ceratinizada de ratos .....	67
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	70
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	80
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	81
<b>ANEXOS</b> .....	94

# *Introdução*

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, no Brasil, nos deparamos com um fenômeno de transição epidemiológica denominado polarizado prolongado, trata-se de um conjunto de fatores relacionados ao aumento da expectativa de vida da população, aliado a redução de fecundidade e mortalidade. Esse efeito reflete no envelhecimento da população brasileira, na qual segundo projeções, em 2020 representará cerca de 13% da população. Diante de uma porcentagem tão expressiva, é necessário garantir que a população idosa possa dispor de recursos que garantam sua saúde e bem-estar social, sobretudo, por considerar que estão mais propensos ao desenvolvimento de doenças crônicas, que quando não tratadas, podem impactar na qualidade de vida dos idosos (CAMPOS; GONÇALVES, 2017).

Uma condição clínica muito comum em idosos relacionada à infecção por fungos do gênero *Candida* é uma lesão conhecida por estomatite protética. Trata-se de uma lesão associada ao uso de prótese dentária, na qual o fungo irá se fixar neste dispositivo e irá promover infecção e inflamação da mucosa (PLAS, 2016; SALERNO et al., 2011; MILLSOP; FAZEL, 2016). Clinicamente, a estomatite protética é caracterizada pela presença de eritema e forte edema na mucosa, além de dor, ardor, boca seca, mau hálito, paladar fétido, sangramento, vermelhidão, formigamento, coceira, entre outros (SIMÕES; FONSECA; FIGUEIRAL, 2013; RODRÍGUEZ ORTEGA et al., 2002).

Uma das espécies mais relacionadas à candidíase é *Candida albicans*, contudo, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida dubliniensis* estão emergindo como espécies causadoras de candidíase, demonstrando diferentes perfis de resistência fúngica e especificidades no tratamento (RODLOFF; KOCK; SCHAUMANN, 2014). O tratamento se dá pelo uso de medicamentos antifúngicos, entretanto, há alguns fatores alarmantes, tais como: o crescente aumento da resistência fúngica e as poucas opções disponíveis, restritas a 3 classes: poliênicos, azólicos e equinocandinas (VIEIRA; SANTOS, 2017; LIMA et al., 2013).

Dessa maneira, a pesquisa de produtos naturais com atividade antifúngica tem sido uma alternativa para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas para a candidíase oral/estomatite protética, sobretudo, por haver a possibilidade de desenvolvimento de uma formulação fitoterápica, que por vezes, pode constituir-se

uma opção mais acessível que os fármacos antifúngicos padrão e com a presença de menores riscos de toxicidade ao indivíduo acometido por esta condição clínica.

Os óleos essenciais (OE) provenientes de plantas medicinais podem ser considerados uma opção promissora na pesquisa de novos agentes antifúngicos, uma vez que, alguns deles possuem atividade antimicrobiana e, por vezes, os OE se apresentam eficientes aos microrganismos resistentes na terapêutica da candidose oral (MATASYOH et al., 2009).

Dentre as plantas medicinais, destaca-se *Coriandrum sativum* L., conhecido popularmente por Coentro. Essa planta é de fácil cultivo e completamente adaptada às condições geográficas brasileiras sendo também amplamente utilizada na culinária do nordeste brasileiro e sua exploração com finalidade medicinal representa importante estratégia para promoção do desenvolvimento econômico e social regional (SILVA; COELHO JÚNIOR; SANTOS, 2012).

*C. sativum* L. também possui uma notória atividade antifúngica, conforme já fora demonstrado por Freires et al. (2014). Em estudos anteriores, a atividade antifúngica do OE de *C. sativum* L. frente a espécies de *Candida* envolvidas em infecções da cavidade bucal foi comprovada, por meio de estudos *in vitro*, demonstrando satisfatória atividade antifúngica com valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) abaixo de 125 µg/mL, além de apresentar inibição de crescimento fúngico durante o ensaio de cinética de crescimento microbiano, bem como, apresentou capacidade de redução de biofilme multiespécie de *Candida* spp. (BARBOSA, 2021).

Além de elucidar a atividade antifúngica por meio de mais ensaios microbiológicos, também é necessário discutir sobre os possíveis efeitos tóxicos decorrentes do uso do OE de *C. sativum* L. Apesar das plantas medicinais, geralmente, serem menos tóxicos que os medicamentos padrão na terapêutica antifúngica, ainda assim não são destituídos de possíveis efeitos indesejados. Dessa forma, este estudo objetivou avaliar com mais profundidade a atividade antifúngica do OE de *C. sativum* L., bem como, verificar a possibilidade de surgimento de efeitos tóxicos do OE de *C. sativum* L. na forma isolada e como princípio ativo de uma formulação farmacêutica do tipo hidrogel em modelos de estudo *in vitro* e *in vivo*. Para tanto, as hipóteses verificadas orbitam na investigação do efeito antifúngico (grau de sensibilidade de uma cepa), ausência de toxicidade sobre células humanas e de animais. Por fim, investigou-se a hipótese de que o hidrogel contendo *C. sativum* L.

seja seguro em diferentes concentrações, em ratos. Esse conjunto de resultados contribuirá para o desenvolvimento futuro de ensaios clínicos que visem assegurar a segurança e eficácia dessa formulação contendo OE de *C. sativum* L.

# *Objetivos*

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral:

Produzir um hidrogel contendo óleo essencial de *C. sativum* L. e avaliar o efeito antifúngico sobre *Candida* spp. envolvidas com infecções da cavidade bucal, bem como, verificar o perfil toxicológico deste produto.

### 2.2 Objetivos específicos:

- Produzir e caracterizar um hidrogel para uso externo contendo óleo essencial de *C. sativum* L.;
- Demonstrar o perfil de constituintes químicos do OE de *C. sativum* L. em diferentes períodos de tempo;
- Verificar os efeitos do óleo essencial de *C. sativum* L. sobre a morfologia de fungos do gênero *Candida*;
- Definir o grau de sensibilidade da cepa de *Candida albicans* ATCC 60193 frente ao hidrogel contendo *C. sativum* L.;
- Avaliar o efeito do óleo essencial de *C. sativum* L. sobre o biofilme multiespécie bucal;
- Verificar a citotoxicidade do óleo essencial de *C. sativum* L. sobre queratinócitos humanos não tumorais;
- Avaliar a atividade citotóxica do óleo essencial de *C. sativum* L. sobre eritrócitos humanos;
- Avaliar genotoxicidade *in vivo* do OE de *C. sativum* L. em camundongos pelo número de eritrócitos micronucleados;
- Avaliar segurança *in vivo* do uso da formulação tópica do OE de *C. sativum* L. em mucosa bucal queratinizada de ratos.

*Referencial teórico*

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Gênero *Candida* e suas características

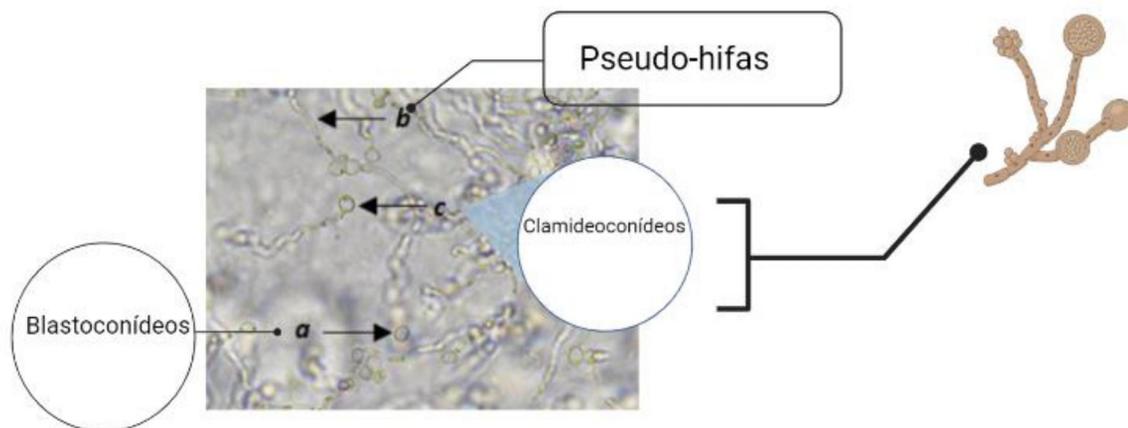
Os fungos do gênero *Candida* são conhecidos por serem o agente etiológico da condição clínica intitulada candidíase. Há diversos tipos de candidíase, a depender do local do corpo acometido pela infecção, a exemplo de: candidíase vulvovaginal, candidíase oral, candidíase de esôfago, candidíase na pele (intertrigo), candidíase disseminada, entre outros (CRUZ et al., 2020; SHARMA, 2019; ALAMON-REIG; RIZO-POTAU; RIQUELME-MC LOUGHLIN, 2021). Contudo, a candidíase oral tem cada dia mais ganhado destaque, devido sua prevalência clínica, e este será o foco da presente revisão de literatura.

No tocante a dados epidemiológicos, as infecções por gênero *Candida* são uma preocupação a nível global, visto que estas infecções estão elencadas como a terceira causa que contribuem para o desenvolvimento de quadros de septicemia. No que se refere ao Brasil, trata-se do sétimo agente etiológico mais identificado em infecções sanguíneas, com taxa de mortalidade orbitando em 72% (SILVA et al., 2021).

A candidíase pode apresentar quadro clínico leve com lesões superficiais na pele e mucosas, mas caso não haja o tratamento adequado, pode-se evoluir para uma forma grave, conhecida como candidemia, isto é, sua forma sistêmica disseminada. Vale salientar que, em 95% dos casos de candidemia, as espécies de *Candida* relacionadas a estas infecções são: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* e *Candida auris* (MCCARTY; WHITE; PAPPAS, 2021). Vale salientar que, *C. albicans* é a espécie mais prevalente em infecções fúngicas do gênero *Candida*, representando cerca de 70% dos casos (TALAPKO et al., 2021).

Em termos de classificação taxonômica, os fungos do gênero *Candida* pertencem ao reino *Fungi*, divisão *Deuteromycota*, classe *Blastomycetes*, família *Cryptococcaceae* (PARDI; CARDOZO, 2002). Estes fungos têm uma característica conhecida por polimorfismo morfológico, ou seja, uma capacidade de adaptação a diferentes condições de temperatura e que contribui para uma maior virulência do fungo. Assim, quando se encontra na forma leveduriforme, este fungo estará colonizando de forma assintomática em um estado saprofítico, isto é, conseguindo nutrientes para sua sobrevivência a partir de matéria orgânica. Contudo, quando este fungo estiver causando infecções (candidíase), se encontrará na forma filamentosa,

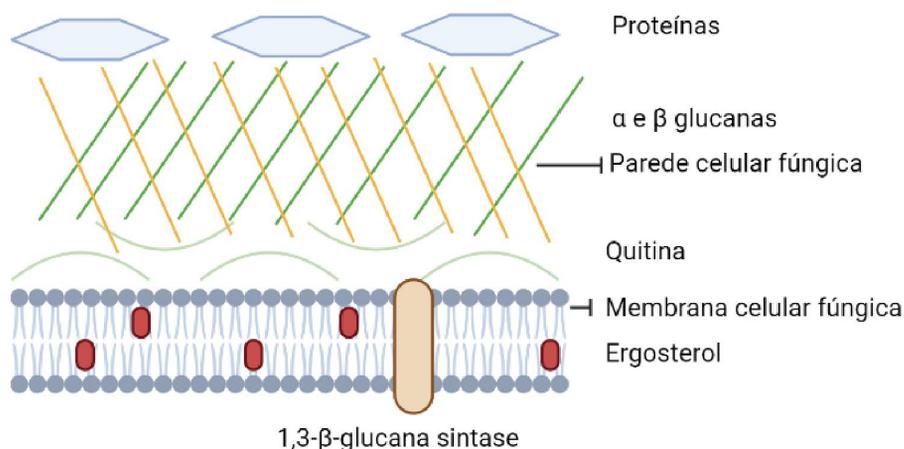
associado a uma condição patológica. As características morfológicas podem ser visualizadas na figura 1 (ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007; DA SILVA, 2020; DE ROSSI et al., 2011).



**Figura 1.** Aspectos morfológicos da forma filamentosa de um fungo do gênero *Candida*, evidenciando a presença de blastoconídios, pseudo-hifas e clamideoconídeos. Adaptado de MELO, 2021)

No que se refere aos aspectos estruturais destes fungos, trata-se de organismos eucarióticos que apresentam parede celular formada por quitina, manoproteína, betaglucanas e proteínas. Além disso, a membrana celular também é de suma importância, pois abriga a enzima 1,3- $\beta$ -glucana sintase que está envolvida na formação de beta-glucanas, componente da parede celular. A membrana celular também é responsável, através da presença da bicamada lipídica, pela comunicação celular usando as vias de transdução de sinais (DA ROCHA et al., 2021; GAVIRIA; CARNERO, 2021; PARDI; CARDOZO, 2002; TALAPKO et al., 2021).

Por conseguinte, a membrana é envolta da presença de ergosterol, um esteroide sintetizado no retículo endoplasmático, que por sua vez, é biossintetizado pela enzima lanosterol 14- $\alpha$ -demetilase. Já a parede celular tem função de proteção às condições de estresse e dos mecanismos de defesa, além de promover adesão à célula do hospedeiro. Vale salientar que, esse conjunto de componentes estruturais representará alvo farmacológico de fármacos das diferentes subclasses de antifúngicos, isto é, cada fármaco terá um alvo específico (DA ROCHA et al., 2021; GAVIRIA; CARNERO, 2021; PARDI; CARDOZO, 2002; TALAPKO et al., 2021).



**Figura 2.** Representação esquemática da estrutura celular de um fungo, dando destaque a parede celular e membrana celular fúngica. Fonte: autor.

No que tange ao acometimento da candidíase oral no indivíduo, já foi destacado que ocasiona-se pela colonização de fungos do gênero *Candida*. Contudo, é importante mencionar que estes fungos podem habitar a cavidade bucal de indivíduos sem o desenvolvimento desta condição clínica, assim, pode-se dizer que em situações de homeostase, estes fungos habitarão de maneira comensal. Contudo, também pode-se considerar os fungos do gênero *Candida* como oportunistas, pois em situações de desequilíbrio da homeostase, sobretudo, queda da imunocompetência e desregulação na microbiota bucal, o fungo poderá tornar-se patogênico e, assim desenvolver a candidíase oral (CAROLUS; VAN DYCK; VAN DIJCK, 2019; SHARMA, 2019).

Como foi visto, algumas situações comprometem a homeostase, neste caso, trata-se dos fatores predisponentes para desenvolvimento da candidíase oral. Um dos fatores é o uso de próteses dentárias, pois promovem acidificação e um ambiente anaeróbio, favorecendo o crescimento fúngico. Além disso, um fator predisponente de grande relevância clínica é quando o sistema imune encontra-se deficiente, como em casos de uso de imunossupressores, transplante de órgãos, síndrome da imunodeficiência adquirida (HIV/Aids), ou seja, condições que causem a depleção do sistema imune. Por fim, destacam-se também como fatores predisponentes: ulceração da mucosa oral, má higiene oral, hipossalivação, tabagismo, deficiências nutricionais, endocrinopatias, como diabetes mellitus e uso por longos períodos de medicamentos das classes dos corticosteróides e antibióticos (BORGES et al., 2021; TALAPKO et

al., 2021; TEODORO et al., 2020).

A patogênese da candidíase oral ocorre por meio dos seus inúmeros fatores de virulência. O polimorfismo morfológico é um fator de virulência relevante frente a adaptabilidade de diferentes condições de temperatura, uma vez que transforma-se de levedura para hifas patogênicas. Além disso, destaca-se a adesão às células epiteliais do hospedeiro por endocitose fazendo uso das proteínas para invasão e ancoragem, como as invasinas ALS3 e SSA1 (MAYER; WILSON; HUBE, 2013; YOO et al., 2020). A endocitose acontece por meio da entrada das hifas. Essa formação de hifas está relacionada a sinalização pela proteína quinase A dependente de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) (TALAPKO et al., 2021).

Assim, inicialmente, é necessária a adesão, que é feita pelas adesinas. Trata-se de proteínas de sequência semelhantes as aglutininas (ALS). Outra maneira de promover a adesão é por meio da penetração direta na membrana plasmática das células epiteliais da mucosa oral, assim, após a penetração, ocorrerá a invasão por fungos do gênero *Candida*. Uma adesina de bastante relevância é a Hwp1 envolvida na formação da parede hifálica, além das adesinas ALS1-7, ALS3 e ALS9. Vale salientar que, ALS3 contribui para formação de biofilme em superfícies abióticas. (PRASATH et al., 2020; TALAPKO et al., 2021).

Contudo, a parede celular do fungo é espessa, conforme já demonstrado na figura 2, e os componentes forma uma rede tridimensional, sendo assim, faz-se necessário que os componentes de membrana atuem para ligação com as células do hospedeiro. Há o reconhecimento do patógeno por células imunes, uma vez que, os monócitos e macrófagos são capazes de reconhecerem alguns componentes estruturais do fungo, como a quitina, por exemplo. Assim, o reconhecimento acontece por meio de diferentes Reconhecimentos dos Padrões de Hospedeiros (RPHs), mas o patógeno ainda assim consegue driblar alguns mecanismos de defesa do indivíduo e propagar a infecção fúngica no local (YOO et al., 2020).

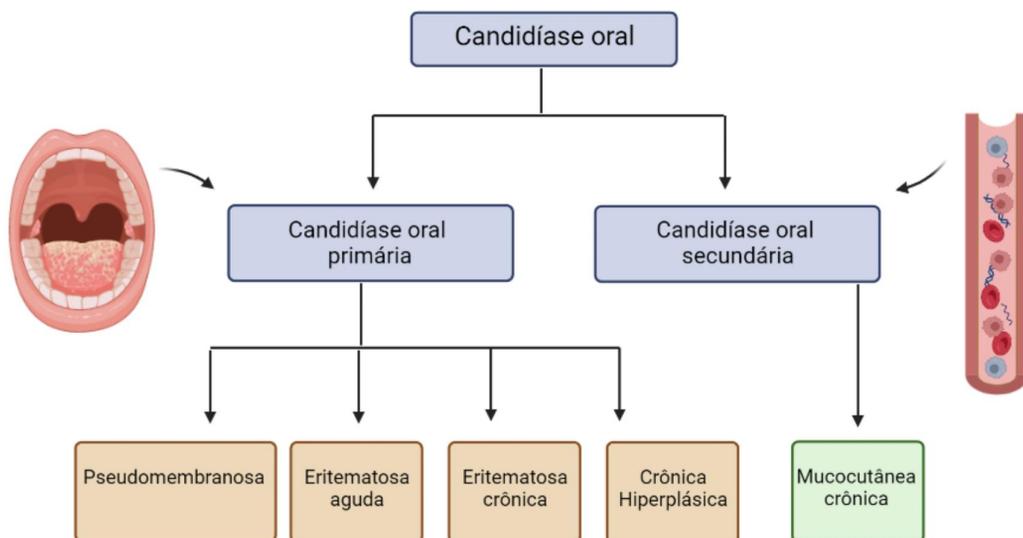
Outro fator de virulência são as toxinas envolvidas, a exemplo da candidalisina, uma vez que é responsável por deteriorar a célula do hospedeiro através da criação de poros, e está envolvida numa maior progressão da candidíase para um quadro sistêmico. Por outro lado, também há fatores de virulência bem estabelecidos, como a formação de biofilme. Trata-se de uma comunidade de complexa estrutura que se instaura na superfície das células do hospedeiro ou em superfícies abióticas, com tigmotropismo (ingestão extracelular de cálcio) e formação de um ambiente hipóxico

(TALAPKO et al., 2021)

De modo geral, o biofilme se desenvolve através da adesão das células fúngicas ao substrato com formação de hifas, seguido da maturação do biofilme e sua matriz polissacarídica extracelular e, por fim, a dispersão de células que não ficaram íntegras no biofilme, estas células poderão colonizar outras superfícies e formar novos biofilmes. Vale salientar que, as células de *C. albicans* quando em estado de formação de biofilme liberam mais 1,3- $\beta$ -glucana na matriz extracelular. Alguns fatores de transcrição são importantes para formação de biofilme nas mucosas, a exemplo de Bcr1 com alvo em Hwp1. Por fim, ainda sobre os fatores de virulência, há a secreção de enzimas hidrolíticas, tais como: aspartil protease secretada (APS), fosfolipase e hemolisina, que contribuem para adesão, invasão da mucosa e dificultam os mecanismos de defesa do hospedeiro (TALAPKO et al., 2021).

### **3.2 Considerações clínicas e tipos de candidíase oral**

A candidíase é denominada do tipo oral quando acomete a mucosa oral do indivíduo, possuindo variadas manifestações clínicas. De modo geral, os sinais e sintomas mais comuns são perda do paladar, queimação ou dor na boca, sangramento, constituindo fatores limitantes para alimentação. Porém, a enfermidade pode atingir outros tipos de manifestações clínicas, assim, a candidíase oral pode ser classificada, levando em consideração o diagnóstico clínico baseado nos sinais e sintomas em: candidíase oral primária ou secundária. Vale salientar que, será primária quando acometer apenas a cavidade oral e área perioral, diferentemente da secundária que está relacionada a uma condição sistêmica. A candidíase oral primária é subdividida em candidíase pseudomembranosa, candidíase eritematosa aguda, candidíase eritematosa crônica e candidíase crônica hiperplásica. Já a candidíase oral secundária é representada pela candidíase mucocutânea crônica. Há ainda as lesões associadas à colonização por fungos do gênero *Candida*, tais como: estomatite protética, queilite angular e glossite rombóide mediana (TALAPKO et al., 2021; XIAO et al., 2020).



**Figura 3.** Representação esquemática sobre a classificação dos tipos de candidíase oral. Fonte: autor.

A candidíase pseudomembranosa tem como principal característica a presença de placa pseudomembranosa branca ou amarelo claro, semelhante a um leite coalhado, podendo acometer superfície labial e bucal, palato mole e região retromolar. Estas placas são moles ao contato e através da raspagem pode-se remover essa placa. Trata-se do tipo mais recorrente em candidíase oral primária. (DOS SANTOS et al., 2022; HERNAWATI, 2018).

Outro tipo de candidíase é a eritematosa aguda, também conhecida como atrófica, apresentando-se como pouco comum dentre os tipos de candidíase. Já foi bastante relacionada ao uso irracional de antibióticos. Caracteriza-se por pequenas placas brancas na língua, palato ou na mucosa oral com despilação da língua apresentando dor, queimação intensa, eritema, além da mucosa com manchas vermelhas. Além disso, há também a candidíase eritematosa crônica, que é mais comum em pacientes acometidos pela infecção por HIV, atingindo com mais severidade o dorso da língua e palato (BRASILEIRO et al., 2022; SHARMA, 2019).

A candidíase crônica hiperplásica é um dos tipos mais raros a acometer indivíduos, atingindo níveis abaixo de 2% entre as candidíases orais, e já foi designada como “leucoplasia por *Candida*”. Trata-se de uma lesão oral áspera caracterizada por placas isoladas de coloração branca que podem se encontrar palpáveis ou espessas e aderidas, além de variados nódulos brancos com aspecto eritematoso, sendo não removível por raspagem. De modo geral, deve-se evitar a exposição a agentes que

predisponham o indivíduo ao desenvolvimento da doença, como por exemplo: melhora da higiene oral, evitar usar cigarro, não uso de prótese dentária à noite. Estas recomendações também são compartilhadas para os demais tipos de candidíase. Além disso, deve-se atentar para o diagnóstico diferencial, uma vez que há a possibilidade de, quando não houver tratamento, a evolução para um pior prognóstico relacionado a malignidade, uma vez que fungos do gênero *Candida* possuem a propriedade de desenvolver mecanismos de oncogênese com características carcinogênicas e alterações nos mecanismos inflamatórios (DELGADO AZAÑERO; ARRASCUE DULANTO; LÉVANO LOAYZA, 2021; LORENZO-POUSO et al., 2022).

Já a candidíase mucocutânea crônica está relacionado a formação de granulomas. Trata-se de um tipo de candidíase que, ocasionalmente é visto desde a infância. Essa condição clínica tem sido associada a distúrbios endócrinos e imunológicos. Clinicamente são vistas lesões granulomatosas na região da mucosa oral, eritema de palato duro e placas brancas no dorso da língua (CAREY et al., 2019; TEPAL; BONIFAZ, 2021).

Já no tocante as lesões associadas a *Candida* spp., uma das mais recorrentes é a estomatite protética, pois tem atingido cerca de 72% dos usuários de próteses dentárias. É caracterizada como uma lesão por fungos do gênero *Candida*, em que haverá a colonização e fixação do fungo na mucosa que sustenta a prótese dentária. Por vezes, se apresenta assintomático, mas pode repercutir alguns sinais e sintomas, como eritema, edema, hiperplasia e inflamação da mucosa palatina subjacente à prótese dentária. A prótese dentária possui uma constituição resinosa, este material está passível de adesão e crescimento fúngico devido, geralmente, imperfeições na superfície e falta de ajustes precisos, além de redução do fluxo salivar e condições imunológicas (BAJUNAID et al., 2022; SILVA et al., 2020).

A queilite angular também uma lesão proveniente da infecção fúngica por *Candida* ou outros microrganismos. Geralmente essa lesão inflamatória atinge as comissuras labiais e pele adjacente e se caracteriza como úlceras aftosas, além de eritemas e crostas nestas regiões. Vale salientar que, inicia-se com pequenas rugas que, gradativamente, progridem para lesões com eritema variando entre 4 subtipos. Essa lesão tem sido relacionada ao tabagismo, desnutrição e próteses dentárias ajustadas equivocadamente (CABRAS et al., 2020).

A glossite rombóide mediana é um outro tipo de lesão associada a infecção por *Candida*. Geralmente acomete indivíduos que apresentem anemia ou diabetes

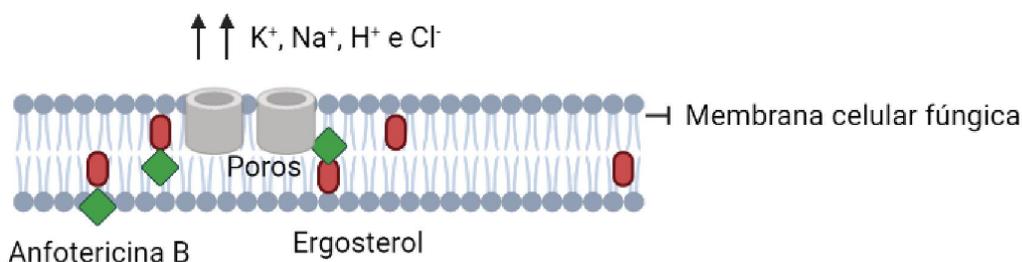
mellitus e até mesmo usuários de aparelhos ortodônticos. Clinicamente se apresenta como uma lesão ulcerada linear com eritema e formação de borda membranosa purulenta na mucosa do dorso da língua com atrofia papilar da mucosa lingual e sensação de dor e queimação, além de eritemas na mucosa palatina. Para fins diagnósticos, pode-se fazer uma biópsia incisional e análise histopatológica. (DA SILVA RAMOS et al., 2021).

### **3.3 Tratamento farmacológico das infecções fúngicas**

Há tratamento farmacológico bem estabelecido para candidíase oral se baseando na administração de fármacos da classe dos antifúngicos, seja de uso tópico, via oral ou sistêmico. Dessa forma, os principais medicamentos antifúngicos utilizados compreendem as classes de antifúngicos: polienos, azóis e equinocandinas. Além disso, esses antifúngicos podem atuar de forma fungistática ou fungicida frente ao crescimento fúngico. (AN; RAFIQ, 2020; BHATTACHARYA; SAE-TIA; FRIES, 2020).

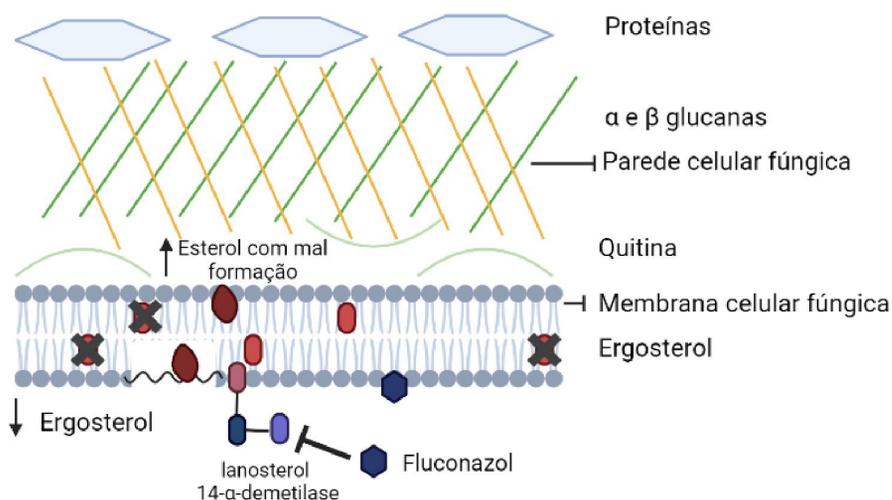
Os antifúngicos mais utilizados, sejam eles da classe dos polienos e azóis atuam tendo como alvo o ergosterol e sua biossíntese. O ergosterol, como já foi dito, é um componente estrutural da membrana celular fúngica. Para que haja a produção de ergosterol, é necessária uma cascata de sinalização enzimática, sendo o ergosterol e os mecanismos envolvidos na biossíntese considerados alvos promissores no desenvolvimento de produtos com atividade antifúngica (BHATTACHARYA; SAE-TIA; FRIES, 2020).

Os polienos são fungicidas e estão representados pelos fármacos nistatina e anfotericina B, sendo o primeiro geralmente usado por via tópica ou suspensão oral e o segundo utilizado para tratamento sistêmico. De modo geral, os polienos agem se ligando ao ergosterol na membrana plasmática induzindo a formação de poros, conseqüentemente, haverá ruptura da membrana e extravasamento de íons ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $H^+$  e  $Cl^-$ ), resultando em uma ação fungicida, isto é, causando a morte fúngica. Contudo, a anfotericina B é conhecida por sua nefrotoxicidade, sendo necessários alguns artifícios farmacológicos, como a complexação com desoxicolato de sódio e formulação lipossomal, trata-se do fármaco geralmente escolhido quando há espécie de *Candida* apresentando resistência fúngica à azólicos, por exemplo. (BHATTACHARYA; SAE-TIA; FRIES, 2020; OK et al., 2020).



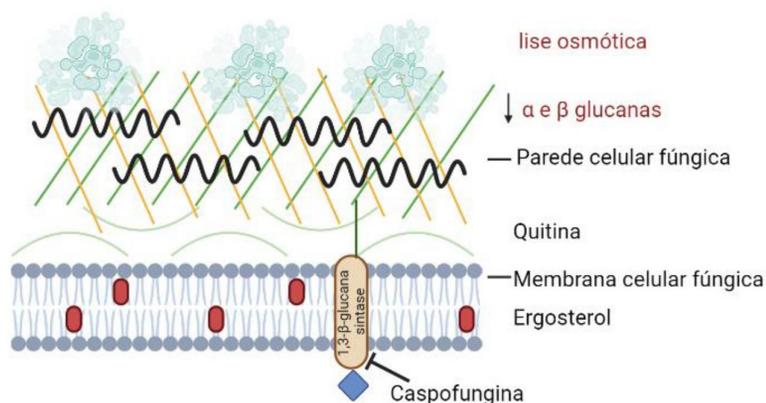
**Figura 4.** Representação esquemática do mecanismo de ação da anfotericina B, pertencente a classe dos polienos. Fonte: autor.

Já os azóis são compostos heterocíclicos que apresentam anel azólico e se subdividem em imidazol (dois nitrogênios no anel azólico) e triazol (três nitrogênios no anel azólico). São representados por fluconazol, cetoconazol, miconazol, itraconazol, entre outros. Entretanto, o fármaco mais utilizado dessa classe é o fluconazol, utilizado por via oral. Trata-se da classe de antifúngicos mais utilizada no tratamento farmacológico de infecções fúngicas por espécies de *Candida*. Seu mecanismo de ação se baseia na ligação com a enzima lanosterol 14- $\alpha$ -demetilase (Erg11p), que é responsável pela biossíntese do ergosterol. Com esta inibição da enzima e da biossíntese de ergosterol, conseqüentemente, haverá a diminuição na produção do ergosterol, componente estrutural da membrana celular. Além disso, outras enzimas regularão a produção de esteroide tóxico fungistático (14 $\alpha$  methylergosta 8-24 (28) dien-3-ol), bem como, haverá aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS), todo esse conjunto de eventos resultará em um pronunciado efeito fungistático, isto é, inibição do crescimento fúngico (BHATTACHARYA; SAE-TIA; FRIES, 2020; OK et al., 2020).



**Figura 5.** Representação esquemática do mecanismo de ação do fluconazol, pertencente a classe dos azóis. Fonte: autor.

Também há a classe das equinocandinas, utilizadas em casos com tendência a formas graves e exposição prévia sem avanço terapêutico a azóis. São representadas por caspofungina, micafungina e anidulafungina. Esses fármacos são fungicidas e atuam através da inibição da enzima 1-3  $\beta$  glucana sintase, responsável pela produção de glucanas, presente em todos os fungos, tornando esses fármacos como antifúngicos de amplo espectro, além disso, as glucanas são componentes estruturais da parede celular fúngica, assim, haverá fragilização da parede celular pela ausência de glucanas, por fim, lise osmótica e morte celular, já que atinge um componente considerado importante na proteção ao estresse osmótico e integridade do fungo (BHATTACHARYA; SAE-TIA; FRIES, 2020; PRISTOV; GHANNOUM, 2019).



**Figura 6.** Representação esquemática do mecanismo de ação da caspofungina, pertencente a classe das equinocandinas. Fonte: autor.

Todavia, apesar dos efeitos terapêuticos dos principais antifúngicos serem bem consolidados, ainda há algumas problemáticas frente a essa classe de fármacos, que são o surgimento da resistência fúngica e dos pronunciados efeitos colaterais devido sua toxicidade.

A resistência aos polienos envolve modificações na membrana plasmática dificultando acesso do fármaco ao sítio de ligação na membrana e diminuição de esteróis e ergosterol, gerando irregularidade nas bombas de efluxo, além de mutações no gene ERG3, resultando em diminuição terapêutica da anfotericina B e inativação de bombas de efluxo, vale salientar que, são raros os casos de resistência a este fármaco. Outrossim, tem se demonstrado preocupante a resistência aos azóis, se apresentando mais comum, devido ao uso desses fármacos por longos períodos, uma vez que poderão haver mudanças na morfologia fúngica, tornando-os resistentes a

ação desses fármacos, além disso, também há espécies de *Candida* que apresentam resistência intrínseca ao azóis. Ademais, apesar de constituir casos raros, atualmente já há casos de resistência às equinocandinas, através de mutações nos genes FKS, que codificam a enzima 1,3  $\beta$  glucana sintase, que é responsável pela produção de glucanas, ocasionando modificações na estrutura dessa enzima e diminuindo a ligação com fármacos como caspofungina, havendo a continuidade da produção de glucanas e falha terapêutica (DA SILVA; SANCHES; CHASSOT, 2022).

Por fim, também se apresenta como uma problemática os efeitos colaterais decorrentes do uso de fármacos antifúngicos. Dentre o uso de fármacos da classe dos polienos, pode-se destacar os efeitos colaterais da anfotericina B, tais como: efeitos adversos a nível renal, cardiovascular, neurológicos, entre outros. Já a nistatina geralmente é bem tolerada. Além disso, os azóis também apresentam alguns efeitos colaterais pronunciados, pode-se exemplificar através dos efeitos colaterais do fluconazol e itraconazol: náuseas, vômitos, diarreia, dor abdominal, entre outros. (OK et al., 2020).

### **3.4 Plantas medicinais e *Coriandrum sativum* L.**

As plantas medicinais são substâncias produzidas pela natureza. Trata-se de uma fonte de prospecção de moléculas bioativas e novos agentes terapêuticos para o tratamento de doenças que tem sido utilizado ao longo dos anos, visto que até 2006, grande parte dos fármacos aprovados foram obtidos de plantas medicinais, exemplifica-se no tratamento de doenças infecciosas, câncer, doenças cardiovasculares, infecções fúngicas, entre outros, uma vez que através de seus receptores são capazes de formar ligação com alvos biológicos. Esses produtos diferem das moléculas sintéticas, uma vez que são codificado geneticamente pelo metabolismo da planta por apresentarem grande massa molecular, elevados átomos de carbono  $sp^3$ , átomos de oxigênio e centros quirais, menor quantidade de anéis aromáticos, maior rigidez molecular por estruturas tridimensionais complexas, proporcionando mais alvos biológicos. (ATANASOV et al., 2021; CHEN et al., 2020; PEDROSO et al., 2019; WRIGHT, 2019).

Além disso, as plantas medicinais, valorizadas pela medicina tradicional e uso popular das plantas, apresentam diversos compostos bioativos compondo uma diversificação no aspecto da composição química. Outrossim, deve-se atentar na

identificação desses compostos bioativos. Contudo, o uso da química combinatória e anseios da indústria farmacêutica tem diminuído a busca por produtos naturais no desenvolvimento de medicamentos. Outro fator que tem diminuído a busca por plantas medicinais é sua complexidade, visto que a identificação dos constituintes requer diversas técnicas de identificação e purificação, tornando as pesquisas honerosas. (ATANASOV et al., 2021; CHEN et al., 2020; WRIGHT, 2019).

Nesse sentido, os metabólitos secundários conferem propriedades de proteção as plantas e fazem parte do processo evolutivo das plantas. São exemplos de metabólitos secundários: terpenos, compostos fenólicos e nitrogenados. Os terpenos se destacam entre os metabólitos secundários, uma vez que são hidrocarbonetos classificados de acordo com a quantidade de carbonos (C), variando de hemiterpenos, monoterpenos a politerpenos. (BORGES; AMORIM, 2020).

Além disso, as plantas apresentam compostos voláteis que podem ser extraídos, conhecidos como óleos essenciais, e que tem como principal característica o aroma, geralmente são compostos por diversos terpenos, como monoterpenos e sesquiterpenos, compostos aromáticos, como aldeído, álcool e terpenóides. Alguns óleos essenciais possuem bioatividade anticancerígena, antidiabética, antidepressiva e notória bioatividade antimicrobiana. A bioatividade dos óleos essenciais é justificada pelos constituintes presentes no óleo, que por vezes, apresentam sinergismo entre os constituintes e seus grupos funcionais. São exemplos de óleos essenciais com bioatividade contra fungos do gênero *Candida*: *Cinnamomum zeylanicum* , *Citrus limon* , *Eugenia caryophyllus* , *Mentha piperita* L. , *Origanum vulgare* L., *C. sativum* L. (BORGES; AMORIM, 2020; PEDROSO et al., 2019; SINGLA; DUBEY, 2019).



**Figura 7.** Folhas de *C. sativum* L. (coentro). Fonte: autor.

Dentre os produtos naturais, destaca-se o *C. sativum* L., cujo nome popular é coentro ou cheiro verde. Essa planta é de fácil cultivo e adaptada às condições geográficas brasileiras sendo também amplamente utilizada na culinária do nordeste brasileiro, sobretudo, como condimentos em pratos típicos. (DE SOUZA et al., 2022). A exploração do coentro com finalidade medicinal representa importante estratégia para promoção regional do desenvolvimento econômico e social. Outrossim, possui fonte de cálcio, pró-vitamina A, vitaminas B1, B2 e C (potencial antioxidante), ferro, magnésio, proteínas, fibras, fósforo, caroteno, sódio, potássio, riboflavina, tiamina, entre outros (DEMARTELAERE et al., 2020).

*C. sativum* L. (coentro) é uma planta hortaliça herbácea composta por flores, folhas e sementes, sendo uma planta nativa do Mediterrâneo e oeste da Ásia que tem sido cultivada em áreas tropicais, como o Brasil. O coentro pertence ao reino Plantae, possuindo a classificação científica: classe Magnoliopsida – Dicotiledôneas, Clado ou ramo Angiospermas e Eudicotiledôneas, família Apiaceae/ Umbelliferae, gênero *Coriandrum*, espécie *Coriandrum sativum*. (BRANDÃO et al., 2022; BRIDGEMOHAN et al., 2021; KHAKSHOUR et al., 2021; MAHLEYUDDIN et al., 2021).

Pode-se destacar os resultados de estudos que verificaram as diversas bioatividades das sementes ou folhas em extrato ou óleo essencial de *C. sativum* L., dentre as quais: diurético, antiespasmódico, antigripal, analgésico, antioxidante (DEMARTELAERE et al., 2020), antimicrobiana (KACANIOVÁ et al., 2020), anti-hipertensiva e antiaterogênica, antiarrítmica, hipolipidêmica (MAHLEYUDDIN et al., 2021), antiinflamatória e antidiabética (MECHCHATE et al., 2021), anticancerígeno (ELMAS et al., 2019), analgésica (YADAV et al., 2021), ansiolítico (PATHAN; KOTHAWADE; LOGADE, 2011), entre outros.

Além disso, o uso etnofarmacológico, isto é, as informações de uso medicinal advindas da comunidade, destacaram que na região Asiática, o óleo essencial de *C. sativum* L. tem sido usado para estimular a secreção gástrica, tratamento de úlceras gástricas e infecções bucais; na Índia as sementes são utilizadas para artrite reumatóide, inflamações e dores nas articulações; na China algumas partes da planta são usadas para sarampo, diabetes e gastroenterites; na Índia as folhas são utilizadas como estimulante e carminativo, alívio estomacal, contra afecções que atingem a bile, contra desconforto abdominais e já na farmacopéia européia cita-se o uso contra vermes e tratamento de reumatismo (MAHLEYUDDIN et al., 2021).

*C. sativum* L. também possui notória bioatividade contra fungos do gênero *Candida*, conforme já foi demonstrado por diversos estudos que apresentaram valores de CIM variando entre 15 a 125 µg/mL para diferentes espécies de *Candida*, também houve inibição na aderência do biofilme contra espécies de *Candida* em concentração de 62,5 µg/mL (FERREIRA et al., 2021; SINGLA; DUBEY, 2019). Estudos anteriores comprovam a atividade antifúngica do óleo essencial de *C. sativum* L. frente a espécies de *Candida*, no qual foi demonstrada excelente bioatividade antifúngica ratificada por valores de CIM e CFM abaixo de 125 µg/mL, além de apresentar inibição de crescimento fúngico durante o ensaio de cinética de crescimento microbiano, bem como, capacidade de redução de biofilme multiespécie de *Candida* spp. (BARBOSA, 2021).

### **3.5 Estudos toxicológicos na prospecção de produtos naturais**

É muito importante na prospecção de produtos naturais com bioatividade farmacológica fazer uma investigação dos possíveis efeitos tóxicos que este produto possa apresentar. Apesar de, por vezes, no uso popular medicinal, as plantas serem administradas de forma empírica, ainda assim necessita-se haver conhecimento de todo o perfil toxicológico do produto natural antes de disponibilizá-lo como medicamento fitoterápico, a fim de evitar consequências negativas na saúde pública (REIS et al., 2021).

As plantas medicinais devem ser afastados do conceito retrógrado de que são inócuos ao indivíduo, uma vez que pesquisas apontam que grande parte das pessoas que fazem uso de plantas medicinais e fitoterápicos desconhecem que estas substâncias são capazes de apresentarem efeitos tóxicos. Dessa forma, essas substâncias devem ser avaliadas do ponto de vista da toxicidade e dos efeitos adversos ao usuário, que podem incluir: toxicidade cardiovascular, espasmos musculares, vômitos, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, irritação na pele, estresse oxidativo, entre outros. Assim, os estudos toxicológicos de produtos naturais visam garantir o uso racional dessas ferramentas terapêuticas, possibilitando garantir informações da indicação terapêutica, dose, posologia e possíveis interações medicamentosas (PEDROSO; ANDRADE; PIRES, 2021).

Uma das possibilidades de se traçar o perfil toxicológico é através da experimentação *in vivo*, isto é, em organismos vivos. Apesar desse tipo de estudo

remontar a antiguidade, ainda assim é muito utilizado em pesquisas e no desenvolvimento de medicamentos, possibilitando aprimoramento de informações de eficácia, mecanismo de ação e perfil toxicológico em organismos vivos, ou seja, uma predição para que possa extrapolar os estudos para ensaios clínicos com seres humanos. Dessa forma, tendo em vista as contribuições para a saúde coletiva, os estudos com modelo animal ainda encontram respaldo, contudo, não podem ser realizados de forma desordenada, há legislações e regras específicas que são adotadas pelos comitês de ética (DOS SANTOS et al., 2021).

Desde 2008, já há a disposição no Brasil a lei 11.794, conhecida como lei Arouca que faz a normatização do uso de animais em laboratório, que por conseguinte, foi responsável pela criação das Comissões de Ética para Uso Animal (CEUA) e Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), padronizando regras e ajudando aos cientistas como atuar em experimentação animal (GUIMARÃES; FREIRE; MENEZES, 2016).

Deve-se ter a garantia de que o número de animais será otimizado através de análise estatística adequada. Contudo, os métodos alternativos para evitar a experimentação em animais adultos tem sido amplamente sugeridos pela Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), se baseando no uso de microrganismos e estágios larvais, além de culturas de células. Outra sugestão são os modelos computacionais *in silico*, que fazem a predição de atividade farmacológica e perfil toxicológico de moléculas sem o uso de animais (DOS SANTOS et al., 2021).

Dessa forma, apenas deve-se partir para estudo com animais, ao se traçar todas as possibilidades de estudos *in vitro* ou recorrer a estudos *in silico*. Portanto, ao submeter os animais a estudos científicos, deve-se garantir a menor exposição possível destes animais a dor e sofrimento, garantindo nutrição adequada, condições apropriadas, uso de anestésicos de primeira linha, uma vez que são seres vivos senscientes (SCHNAIDER; SOUZA, 2003). No intuito de otimizar o número de animais usados em pesquisas, deve-se adotar os 3Rs: substituição, redução e refinamento, bem como, prever efeitos adversos e realização de exames *post mortem* em estudos piloto com objetivo de melhorar o bem-estar animal (WORKMAN et al., 2010).

No desenvolvimento de substâncias de uso tópico não há a obrigatoriedade de estudos de segurança farmacológica, contudo, é necessário saber se essa substância apresenta potencial carcinogênico. Os ensaios *in vivo* de genotoxicidade são

realizados por meio do teste de micronúcleo em células hematopoiéticas de roedores, no qual poderá ser analisado se a substância é capaz de desenvolver mutações gênicas e alterações cromossômicas a nível de DNA, pois havendo indícios de perfil carcinogênico, implica em modificações hereditárias e possibilidade de desenvolver eventos carcinogênicos e mutagênicos no organismo do indivíduo. Esse ensaio é preconizado pela ANVISA e atende ao requisito para estudos clínicos de administração única (ANVISA, 2013).

Outrossim, os micronúcleos são considerados fragmentos ou cromossomos inteiros resultantes do processo de mitose. Dessa forma, quando contabilizados vários micronúcleos em amostras infere-se que houve dano cromossômico. Essa característica do micronúcleo permite-o ser considerado um biomarcador de riscos à saúde do indivíduo. Trata-se de um ensaio que tem sido difundido como triagem do perfil de segurança de substâncias, devido sua simplicidade e análise quantitativa com sensibilidade confiável para atestar substâncias como agentes carcinogênicos/mutagênicos (FREITAS et al., 2020).

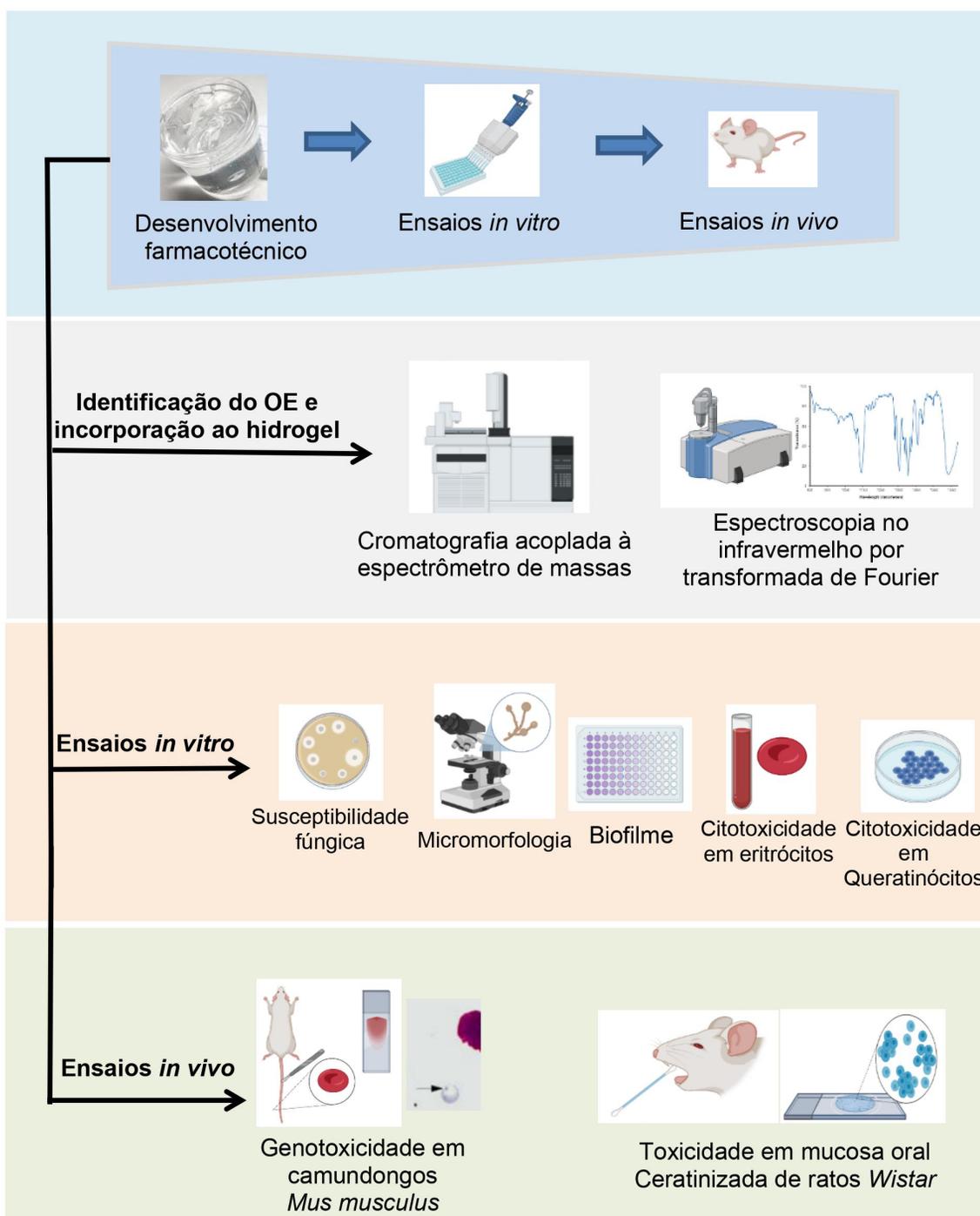
Os ensaios toxicológicos não clínicos são essenciais para a investigação da segurança de uma droga ou produto natural, no entanto, caso esta etapa tenha sido bem sucedida, isto é, se o produto em estudo não seja potencialmente tóxico, segue-se para os estudos clínicos envolvendo seres humanos, os quais podem ser do tipo randomizados (aleatório) ou não randomizado e compostos por 4 fases. A fase I comumente contempla indivíduos saudáveis e verifica-se o surgimento, por ventura, de efeitos adversos e questões relacionadas à segurança e tolerabilidade. A fase II envolve indivíduos não saudáveis, isto é, acometidos pela condição clínica a qual pretende-se tratar, divididos em grupos teste e controle, de forma que pode-se avaliar se a substância-teste possui eficácia no tocante a sua atividade biológica (OLIVEIRA; PARENTE, 2010). Já a fase III são estudos relacionados a segurança e eficácia da substância-teste em comparação ao tratamento padrão ouro ou um grupo em que foi administrado placebo, e por fim, a fase IV que é a fase em que há a realização de estudos após comercialização do produto, a fim de se verificar os efeitos do medicamento na população ao longo do tempo. (SHARMA; SRIVASTAV; SAMUEL, 2020).

# *Materiais e Métodos*

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Etapas gerais do estudo

As etapas gerais contempladas no estudo serão descritas na figura 8 como forma didática e ilustrativa de verificar os ensaios e testes realizados.



**Figura 8.** Esquematização das etapas gerais contempladas no estudo.

#### **4.2 Locais da pesquisa**

- Ensaio *in vitro*: Laboratório de Farmacologia Experimental e Cultivo Celular (LAFECC) – Coordenação: Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro – Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO-CCS-UFPB); Laboratório de Oncofarmacologia (OncoFar) – Coordenação: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marianna Vieira Sobral – Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB-CCS-UFPB); Laboratório de Microbiologia – Coordenação: Prof. Dr. Bruno Bueno Silva – Universidade de Guarulhos (UNG).
- Ensaio *in vivo*: Biotério Prof. Thomas George – Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IpeFarm) e Laboratório de Psicofarmacologia – Coordenação: Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida – Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB – CCS-UFPB).
- Análises histopatológicas: Laboratório de Imunopatologia Experimental (LABIPEX) – Coordenação: Prof. Dr. Adriano Francisco Alves – Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO-CCS-UFPB).
- Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de massas: Laboratório Multiusuário de Caracterização e análises (LMCA) - Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IpeFarm) – Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB – CCS- UFPB).
- Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier: Laboratório de Combustíveis e Materiais (LACOM) – Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN – UFPB).

#### **4.3 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de massas**

Realizou-se a análise cromatográfica a fim de se verificar os constituintes químicos do OE de *C. sativum* L. em diferentes períodos de tempo, ou seja, no ano de 2019 e 2022, empregado um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de

massas (SHIMADZU GC-MS-QP5050A), com coluna capilar (J&W SCIENTIFIC®) e fase estacionária de 5% fenil e 95% dimetilpolisiloxano com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme. A programação de temperatura inicial foi de 60°C a 240°C (3°C/min). O tempo de programação da corrida foi de 60 minutos e a temperatura do forno do injetor de 250°C. O hélio foi utilizado como gás de arraste (fase móvel) a um fluxo de 1,0 mL/min, com razão de Split de 1:20 e o volume de injeção de 1µL.

A ionização dos componentes foi realizada por impacto eletrônico a 70 eV, com detector de 1,25Kv. O espectrômetro foi operado no modo SCAN, varrendo uma faixa de massas de 40 a 500 u.m.a.. A temperatura da fonte de íons foi de 250°C e a identificação dos compostos foi realizada comparando-se seus espectros de massa com os espectros existentes no banco de dados do equipamento. A amostra do óleo essencial de *C. sativum* L. foi injetada a uma concentração de 2 ppm e o hexano foi utilizado como solvente. A análise do cromatograma e espectros de massa foram realizados com auxílio da biblioteca NIST do equipamento, sendo empregados como parâmetros de integração o Width: 3 e o Slope: 2000 (TRINDADE et al., 2015).

#### **4.4 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier**

Nesta metodologia, as amostras de OE de *C. sativum* L., hidrogel sem OE e hidrogel contendo OE foram submetidas a um espectrômetro Shimadzu (modelo IR PRESTIGE-21) para verificar os espectros de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). O aparelho foi configurado para funcionar no modo de transmitância utilizando pastilhas de KBr com 1% de amostra na faixa de comprimento de onda de 400 a 4000 cm<sup>-1</sup> a uma resolução de 4 cm<sup>-1</sup> e número de 30 varreduras acumuladas. Esta técnica possibilita uma avaliação qualitativa, através da visualização dos grupos funcionais da amostra e grupos orgânicos inseridos no silicato (FRANÇA, 2017).

#### **4.5 Ensaios *in vitro***

##### **4.5.1 Teste de susceptibilidade fúngica**

Nesta análise, foi utilizada a cepa padronizada de *Candida albicans* ATCC 60193. Trata-se de um teste de difusão em ágar realizado 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>. Testou-se o OE de *C. sativum* L. incorporado ao hidrogel, formulação esta que irá ser objeto de um processo de depósito de patente no Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI. As concentrações do produto testadas foram: 100 µg/mL; 200 µg/mL; 300 µg/mL; 400 µg/mL; 800 µg/ml ;1 mg/mL; 2 mg/mL; 10.000 µg/mL e 20.000 µg/mL. Esses valores foram propostos a partir de achados prévios (BARBOSA et al., 2023).

As placas de Petri contendo ágar foram preparadas de forma homogênea para todos os grupos. Cada placa recebeu um total de 24 mL do meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose (ASD, São José dos Pinhais – PR, Brasil). Com auxílio de uma alça de inoculação, foram colhidas algumas colônias fúngicas desta cepa, suspensas em 5mL de Caldo Sabouraud Dextrose (CSD) e colocados numa estufa à 35°C. Após 24h, o inóculo foi ajustado e introduzido um swab estéril para ser inoculado em forma de estrias na superfície do meio de cultura ASD em três direções. Das placas previamente inoculadas foram removidas pequenas alíquotas do meio de cultura sólido para a formação dos poços, com o auxílio da borda superior de um tubo de ensaio. Colocou-se uma quantidade de 100mg do hidrogel contendo OE de *C. sativum* L. dentro de um orifício central feito no ágar. Decorrido o período de incubação, os diâmetros dos halos de inibição do crescimento fúngico foram mensurados com um paquímetro digital. Os ensaios foram realizados em triplicata. Miconazol gel (20 mg/g) (Janssen-Cilag Farmacêutica Ltda, São Paulo-SP, Brasil) foi utilizado como controle positivo e hidrogel sem OE como controle negativo (OSTROSKY et al., 2008; ALVES, 2021).

#### 4.5.2 Estudo do efeito do óleo essencial de *C. sativum* L. sobre a redução de biofilme multiespécie bucal

A metodologia detalhada deste modelo de biofilme multiespécie bucal está descrita em Soares et al. (2015) e Miranda et al. (2019). As seguintes espécies bacterianas foram utilizadas: *Actinomyces naeslundii* ATCC12104, *Actinomyces oris* ATCC43146, *Actinomyces gerencseriae* ATCC23840, *Actinomyces israelii* ATCC12102, *Veillonella parvula* ATCC10790 *Actinomyces odontolyticus* ATCC17929, *Streptococcus sanguinis* ATCC10556, *Streptococcus oralis* ATCC35037,

*Streptococcus intermedius* ATCC27335, *Streptococcus gordonii* ATCC10558, *Streptococcus mitis* ATCC49456, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC29523, *Capnocytophaga ochracea* ATCC33596, *Capnocytophaga gingivalis* ATCC33624, *Eikenella corrodens* ATCC23834, *Capnocytophaga sputigena* ATCC33612, *Streptococcus constellatus* ATCC27823, *Eubacterium nodatum* ATCC33099, *Fusobacterium nucleatum vincentii* ATCC49256, *Parvimonas micra* ATCC33270, *Fusobacterium nucleatum polymorphum* ATCC10953, *Campylobacter showae* ATCC51146, *Fusobacterium periodonticum* ATCC33693, *Prevotella intermedia* ATCC25611, *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277, *Tannerella forsythia* ATCC43037, *Eubacterium saburreum* ATCC33271, *Streptococcus anginosus* ATCC33397, *Selenomonas noxia* ATCC43541, *Propionibacterium acnes* ATCC11827, *Gemella morbillorum* ATCC27824 e *Streptococcus mutans* ATCC25175.

A curva de crescimento de todos os microrganismos foi realizada e o inóculo do biofilme foi composto de  $1 \times 10^4$  UFC de cada uma das 32 espécies bacterianas. Brevemente, os biofilmes foram formados por 7 dias, sendo que houve troca de meio nos dias 3 (após 72 h de incubação) e dia 6 (144 horas de formação). Após 6 dias de formação, os biofilmes foram tratados por 24 h. Foi avaliado o efeito do OE de *C. sativum* L. sobre o crescimento de microrganismos, sendo que neste caso, a partir do dia 3, os biofilmes foram tratados diariamente, 2 X/dia, às 10 horas da manhã e 4 horas da tarde, até o fim do experimento. Para o tratamento, os pinos revestidos com os biofilmes foram lavados duas vezes com 200  $\mu$ l de solução de lavagem (1% de PBS) e transferidos para placas de 96 poços contendo diferentes concentrações do óleo essencial (1600; 800 e 400  $\mu$ g/mL), por 1 minuto. A seguir, a placa retornou para o meio de cultura original daquele dia. Para este esquema terapêutico, além do grupo controle sem tratamento, também foi incluído um grupo tratado com padrão-ouro digluconato de clorexidina 0,12 % (Periogard®). (SOARES et al., 2015; MIRANDA et al., 2019).

A percentagem de redução da atividade metabólica de biofilme foi determinada utilizando cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) e espectrofotometria. O substrato branco foi enzimaticamente reduzido a formazano vermelho 1,3,5-trifenil (TPHP) por células vivas bacterianas, devido à atividade de várias desidrogenases. A mudança na cor do substrato foi lida por espectrofotometria para determinar a taxa de redução, que é utilizado como uma medida indireta da atividade metabólica bacteriana.

#### 4.5.3 Estudo do efeito do óleo essencial de *C. sativum* L. sobre a micromorfologia de cepa de *C. albicans*

Os fungos do gênero *Candida* possuem morfologia que pode ser afetada pela ação de produtos com atividade antifúngica. Nesse sentido, esse teste verificou os efeitos do OE de *C. sativum* L. sobre a micromorfologia de leveduras (pseudo-hifas, clamidioconídeos e blastoconídeos) de fungos do gênero *Candida*, sendo a cepa utilizada *C. albicans* ATCC 90028, obtida da American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, EUA). O meio de cultura utilizado para microcultura foi ágar arroz fundido (CA, HiMedia Laboratories, Mumbai, Índia) com Tween 80 (Sigma-Aldrich®). O OE de *C. sativum* L. e nistatina foram adicionados a 1mL do meio de cultura ágar arroz antes de sua solidificação. O OE foi inserido em placa de petri na concentração que corresponde a Concentração Inibitória Mínima (CIM) para a cepa testada, na qual foi de 62,5 µg/ml para *C. albicans* ATCC 90028; Nistatina foi de 1,5 µg/ml para *C. albicans* ATCC 90028. Após a total solidificação do ágar arroz, a levedura foi semeada em duas estrias paralelas, utilizando uma alça microbiológica em 2 estrias paralelas. Essas estrias foram cobertas com lamínulas esterilizadas. Usou-se um papel de filtro estéril embebido de 2mL de água destilada na placa para se mimetizar uma câmara úmida, que permaneceu durante o período de incubação a 35°C, com a placa fechada. Após 24h, as lâminas foram analisadas por microscopia de luz (Nikon Eclipse CI®) com aumento de 400x para verificar a formação, ausência ou modificação de estruturas características de cepas de *C. albicans*. Foram preparadas três placas para cada cepa e três repetições em momentos distintos (ALVES et al., 2013; ALVES, 2021).

#### 4.5.4 Citotoxicidade em eritrócitos humanos

A possível atividade hemolítica do OE de *C. sativum* L. foi verificada usando eritrócitos humanos (tipos O<sup>+</sup>, B<sup>+</sup>, A<sup>-</sup> e AB<sup>+</sup>). Foram coletados cerca de 10 mL de sangue periférico humano de indivíduos adultos e saudáveis voluntários por punção (n=4), através de material estéril comercial (agulhas e seringas BD Plastipak® - BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) e colhidos em tubo a vácuo (Greiner bione,

Vacurette, Americana, SP, Brasil) contendo solução anticoagulante. Feito a coleta, os eritrócitos foram diluído em 80 µL de PBS, de forma que o sangue ficou com concentração equivalente a 5% de hemácias. Após isso, adicionou-se em concentrações seriadas de 62,5 µg/mL a 1000 µg/mL do OE de *C. sativum* L., em triplicata e em três repetições distintas, diluído em 20 µL de PBS. Após isso, incubou-se em 37°C por 1h. A reação de hemólise foi interrompida quando adicionou-se 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). Estas suspensões foram centrifugadas a 1000 G durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Posteriormente, o sobrenadante foi direcionado a uma placa de 96 poços e estimada a porcentagem de hemólise, através da leitura da absorbância em 550 nm usando um leitor de microplacas. A porcentagem de hemólise foi determinada como  $[(Abs_{am} - Abs_{con}) / (Abs_{tot} - Abs_{con}) \times 100]$ , em que  $Abs_{am}$  significa a absorbância da amostra e  $Abs_{con}$  refere-se à absorbância do controle em branco (PBS + 0,5% de Tween 80) e  $Abs_{tot}$  corresponde a absorbância de hemólise total (volume igual da amostra para água Milli-Q) (JAIN et al., 2015; ALVES, 2021).

Os voluntários do estudo que doaram a amostra de sangue periférico autorizaram sua participação por meio da assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido. Esse estudo foi conduzido seguindo os preceitos da Declaração de Helsinque e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal da Paraíba sob o protocolo nº 5.808.797 (aprovado em 12 de Dezembro de 2022). O certificado de aprovação encontra-se no Anexo 1.

#### 4.5.5 Ensaio de citotoxicidade sobre queratinócitos humanos

Os possíveis efeitos citotóxicos do OE de *C. sativum* L. foram avaliados sobre cultura de queratinócitos humanos através do método MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio). As culturas de queratinócitos foram coletadas da pele, e pertencem a linhagem HaCaT (queratinócitos humanos). Essas células foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina, posteriormente as placas foram incubadas a 37°C em uma atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub>. Com o objetivo de determinar os efeitos do OE na

viabilidade celular pelo ensaio de MTT, as células HaCat foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de  $3 \times 10^5$  células/poço. Após um período de 24 h, as células foram tratadas em diferentes concentrações do OE de *C. sativum* L. (4,5 a 300 µg/mL) dissolvidas em DMSO. O experimento foi realizado em quadruplicata. O controle negativo foi tratado com DMSO e o controle positivo com a doxorrubicina. Após a incubação da cultura por 72 h, o sobrenadante foi descartado e a solução de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (5 mg/mL) foi adicionada e incubada por mais 3 h. O formazan depositado foi dissolvido com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) (100 µL) (MOSMANN, 1983). As densidades ópticas foram medidas usando um leitor de microplacas (Synergy HT, BioTek). Os valores de IC<sub>50</sub> foram calculados a partir das curvas dose-resposta usando o software GraphPad Prism 5.0.

## **4.6 Ensaios *in vivo***

### **4.6.1 Animais e Comissão de Ética no Uso de Animais**

Os ensaios *in vivo*, que contemplaram o uso de animais foram dois: genotoxicidade e toxicidade em mucosa oral ceratinizada.

No ensaio de genotoxicidade foram utilizados cinco camundongos machos, suíços albinos (*Mus musculus*), com cinco a seis semanas de idade, com peso aproximado de 95g.

No ensaio de toxicidade em mucosa oral ceratinizada utilizou-se ratos heterogênicos da espécie *Rattus norvegicus*, raça *Wistar*, pesando em média 380g. Esses animais foram fornecidos pela Unidade de Produção Animal (UPA) do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM), da Universidade Federal da Paraíba.

Os ensaios foram realizados após a aprovação do projeto pelo Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa (CEUA) da Universidade Federal da Paraíba, sob número de aprovação 7842290422 (ID 001681). O Certificado de aprovação pela CEUA encontra-se no Anexo 2. Esse estudo com o óleo essencial proveniente de planta medicinal foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) pelo número de cadastro A2D56B0.

#### 4.6.2 Genotoxicidade

Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com a Resolução Nº 90/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária –ANVISA (BRASIL, 2004). Grupos de cinco machos (n=5/grupo) de camundongos suíços albinos, com cinco a seis semanas de idade (*Mus musculus*), pesando aproximadamente 95g, receberam, por gavagem, doses de 20 mg/mL (5 mg/kg) da solução do produto teste (óleo essencial de *C. sativum* L.). O grupo controle negativo recebeu solução salina (solução de 0,9% NaCl e Tween 80 a 2%) e o grupo controle (positivo) recebeu o agente mutagênico (ciclofosfamida), numa dose de 50 mg/kg de peso do animal.

Para realizar o teste do micronúcleo, os animais foram anestesiados com xilazina (5mg/kg) de acordo com os regulamentos existentes para prevenir ansiedade ou medo (estresse) e, em seguida, amostras de sangue foram coletadas em uma pequena incisão da veia caudal de camundongos para o preparo das lâminas de extensões sanguíneas com 10 µL de amostra de sangue, as quais foram analisadas para observação da presença ou não de micronúcleos em eritrócitos (eritrócitos micronucleados) de cada animal. Foram contados cerca de 2000 eritrócitos por animal, através da preparação de três extensões sanguíneas para cada animal. As lâminas foram coradas com corante panótico (Panótico Rápido®) e observadas ao microscópio óptico no aumento de 1000x para a contagem dos micronúcleos. Os dados do ensaio do micronúcleo foram analisados estatisticamente pelo teste t de Student, comparando os grupos tratados com controles. O nível de significância considerado foi de  $p < 0,05$ . Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (ALVES, 2021).

Após o período experimental, os camundongos foram anestesiados com uma sobrecarga de anestésicos dissociativos (cloridrato de cetamina) e agonistas de receptores alfa-2 adrenérgicos (xilazina). No entanto, como se trata de uma sobrecarga de anestésicos, é necessária a aplicação de, no mínimo, 3 vezes a dose anestésica da associação. Dessa forma, os animais foram anestesiados, por via intraperitoneal para ambos os anestésicos, com xilazina 2% (20 mg/mL) em dose letal de 30 mg/kg, e cloridrato de cetamina 10% (100 mg/mL), sendo a dose letal de 300 mg/kg (BRASIL-CONCEA, 2018; FAVORETTO; SEABRA; OLIVATO, 2019). Todos os

procedimentos desde o início do estudo até o momento de eutanásia foram realizados para evitar o sofrimento, reduzir o desconforto e dor dos animais. Este procedimento experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais em Pesquisa (CEUA) da Universidade Federal da Paraíba, sob número de aprovação 7842290422 (ID 001681).

O teste do micronúcleo foi realizado com células do sangue periférico, uma vez que as células da medula óssea podem ser substituídas por sangue periférico como material para o ensaio de micronúcleos. Isto é permitido porque, alternativamente em camundongos, os micronúcleos podem ser analisados em eritrócitos normocrômicos circulantes, enquanto no baço dos animais, não sequestraram os eritrócitos micronucleados do sangue.

#### 4.6.3 Estudo de toxicidade em mucosa oral ceratinizada de ratos

Para este ensaio foram utilizados 15 ratos *wistar* machos (5 animais/grupo), com peso médio de 380 gramas e idade entre 90 a 100 dias, saudáveis. Foi administrado o hidrogel contendo óleo essencial de *C. sativum* L. na dose de 20 mg/mL, além do hidrogel sem princípio ativo, isto é, sem OE de *C. sativum* L. no grupo controle negativo e miconazol 20mg/mL para o grupo controle positivo. (FRIEDMAN et al., 2015). Foram gerados números aleatórios gerados na função “aleatório entre” do Microsoft Excel para a escolha dos animais e atribuição em cada grupo. Os animais foram mantidos em gaiola plásticas e mantidos em uma sala com controle ambiental (temperatura 24°C, umidade relativa 60% e ciclo claro/escuro de 12 horas) e dieta balanceada com ração do tipo “pallet” (Purina) *ad libitum*. A administração das amostras foi feita com o auxílio de uma pinça clínica e uma bolinha de algodão esterilizado na região de palato duro do animal.

Foram feitas três aplicações diárias em intervalos de 8 horas com a administração de 113mg do hidrogel por um período de 15 dias, com o objetivo de assemelhar o esquema de tratamento conhecido de uma infecção fúngica na mucosa oral por *Candida* spp. (LOMBARDI; OUANOUNOU, 2020). Os animais foram cuidadosamente manuseados e monitorados para evitar possíveis riscos de acidente ou intoxicação. A aplicação foi realizada com bastante delicadeza para que não machucasse a mucosa palatina do rato e observou-se durante os 15 dias de

realização do estudo, se houve alguma reação indesejada, como perda de peso, inflamação ou ulceração da mucosa (ALVES, 2021).

Todos os animais após período de uso do hidrogel, foram submetidos à análise clínica e histopatológica a partir da realização de biópsia excisional da mucosa do palato duro. O procedimento foi feito após pré-anestesia (cloridrato de cetamina e xilazina). Após o período experimental, os ratos foram anestesiados com uma sobrecarga de anestésicos dissociativos (cloridrato de cetamina) e agonistas de receptores alfa-2 adrenérgicos (xilazina). No entanto, como se trata de uma sobrecarga de anestésicos, é necessária a aplicação de, no mínimo, 3 vezes a dose anestésica da associação. Dessa forma, os ratos foram anestesiados, por via intraperitoneal para ambos os anestésicos, com xilazina 2% (20 mg/mL) em dose letal de 30 mg/kg, e cloridrato de cetamina 10% (100 mg/mL), sendo a dose letal de 180 mg/kg (BRASIL-CONCEA, 2018; FAVORETTO; SEABRA; OLIVATO, 2019). Todos os procedimentos desde o início do estudo até o momento de eutanásia foram realizados para evitar o sofrimento, reduzir o desconforto e dor dos animais.

Os tecidos obtidos a partir da biópsia excisional da mucosa do palato duro foram fixados em formol tamponado a 10% (pH 7,4) por 72h. Os cortes histológicos obtidos por micrótomo, com 4 µm de espessura, foram colocados em lâminas de vidro e corados por coloração Hematoxilina e Eosina, que permitiu fazer a avaliação histológica de possíveis efeitos inflamatórios na mucosa do palato duro dos animais dos grupos testados através de microscopia de luz. A classificação dos eventos histológicos se deu através da presença de células inflamatórias, alteração da população das células residentes do tecido conjuntivo, características da substância intercelular amorfa e da substância intercelular fibrosa. O material foi classificado por um único examinador e os eventos histológicos foram descritos após a realização do processamento das amostras (ALVES, 2021).

#### 4.7 Análise estatística

Os resultados foram expressos pela média  $\pm$  desvio-padrão após análise de normalidade (teste de Kolmogorov-Smimov). A análise estatística dos dados foi realizada usando análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).

# *Resultados*

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análise fitoquímica do óleo essencial de *Coriandrum sativum* L.

Os constituintes voláteis do OE de *C. sativum* L. foram identificados através da análise das moléculas com maior índice de similaridade com o da biblioteca NIST Mass Spectral Library (National Institute of Standards and Technology), neste sentido, também usou-se como parâmetro o tempo de retenção (Tr), além da proporção de massa em relação à carga (m/z) de cada constituinte químico.

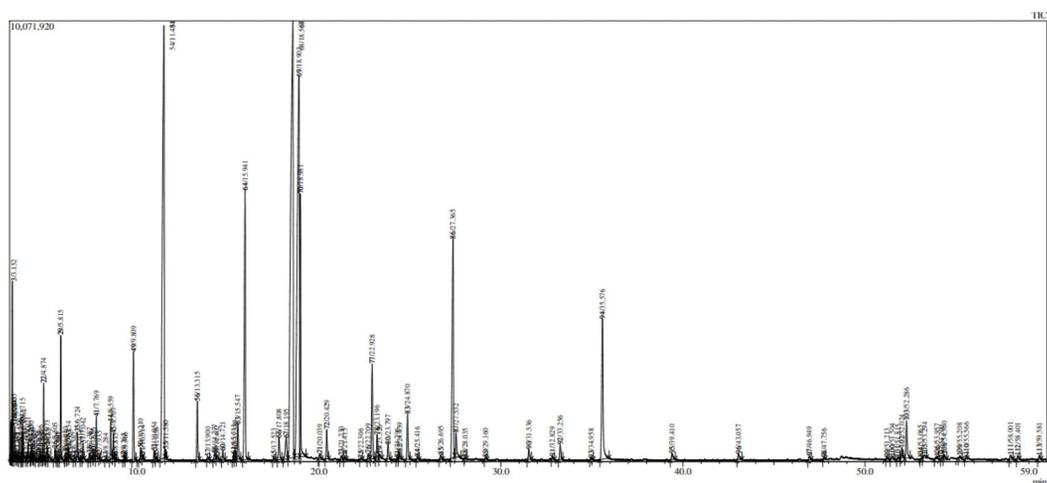
As análises cromatográficas identificaram mais de 110 constituintes em ambos os períodos de análise (2019 e 2022) da amostra de OE. Na tabela 1 encontram-se os 25 constituintes principais presentes no OE de *C. sativum* L. Os constituintes majoritários foram, em 2019: 2-decenal (21.12%), cyclooctanol (16.39%), 1,6-octadien-3-ol (15.20%); decanal (6.24%), 2-dodecenal (5.64%); Já em 2022: 2-decen-1-ol (22.42%), dec-(2E)-enal (19.31%), 1,6-octadien-3-ol (13.41%), dodec-(2E)-enal (5.62%), decanal (5.26%). Os cromatogramas de ambas as análises estão presentes nas figuras 9 e 10.

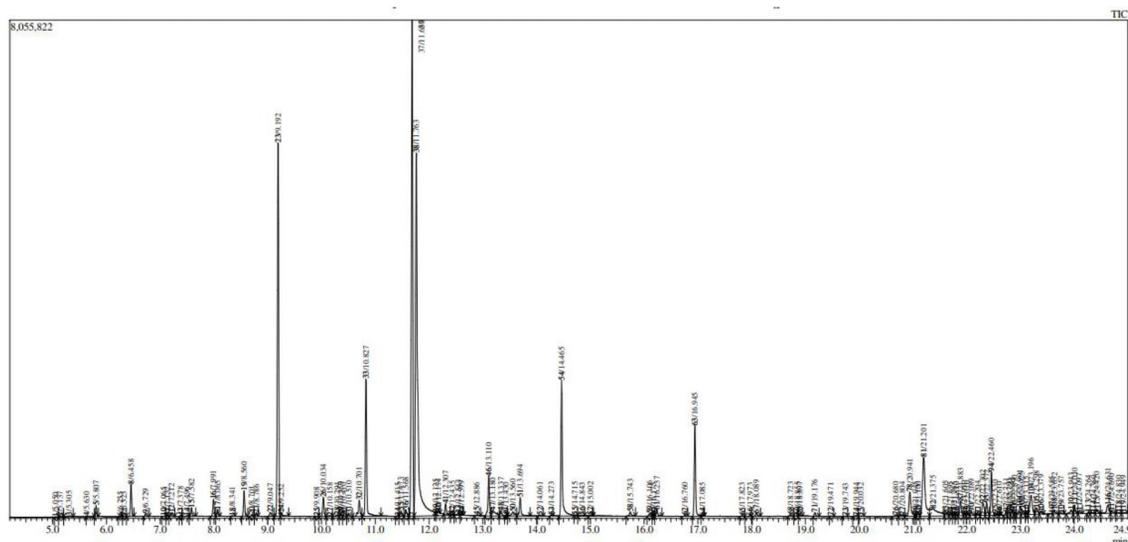
Vale salientar que, diversos constituintes identificados na análise de 2019 encontram-se preservados na amostra de OE que foi novamente analisada por CG-EM em 2022, à exemplo de: 3-hexen-1-ol, nonane, alpha-pinene, octanal, 1,6-octadien-3-ol, camphor, 2-decenal, decanal, undecanal, 1-decanol, 2-dodecenal, tetradecanal, 1-octadecyne, entre outros. Esses constituintes apresentam grupos funcionais variados, perpassando álcoois, como 3-hexen-1-ol, monoterpenos, como geraniol, linalool e camphor à aldeídos, como decanal.

2019			2022		
Tr	Área(%)	Constituintes	Tr	Área(%)	Constituintes
3.152	1.53	Octane	5.137	0.06	3-Hexen-1-ol
4.021	0.24	3-Hexen-1-ol	5.807	0.34	Nonane
4.20	0.15	Cyclohexanol	6.458	1.09	Alpha-pinene
4.874	0.81	Nonane	7.582	0.33	Octanal
5.815	1.57	Alpha-pinene	9.192	13.41	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-
6.724	0.42	3-Hexen-2-one	10.034	0.72	Camphor
7.769	0.61	Octanal	10.701	0.80	2-Decenal

9.809	1.82	1,4-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)	10.827	5.26	Decanal
10.210	0.18	1-octanol	11.415	0.03	2,6-Octadienal, 3,7-dimethyl-
11.481	15.20	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl (Linalool)	11.568	0.30	Geraniol
13.315	1.13	Camphor	11.686	19.31	Dec-(2E)-enal
14.277	0.56	trans-2-Dodecen-1-ol	11.763	22.42	2-decen-1-ol
15.941	6.24	Decanal	12.307	0.40	Undecanal
18.567	21.12	2-Decenal	12.599	0.04	1-decanol
18.903	16.39	Cyclooctanol	13.180	0.56	2-decen-1-ol
18.981	4.77	1-Decanol	13.694	0.83	Dodecanal
20.429	0.60	Undecanal	14.465	5.62	Dodec-(2E)-enal
22.306	0.03	2-Undecenal	16.945	3.34	Tetradec-2-enal
22.709	0.14	1-Undecanol	16.106	0.13	2-dodecenal
24.870	1.07	Tetradecanal	16.237	0.27	Tetradecanal
27.365	5.64	2-Dodecenal	20.941	1.41	Trans-2-dodecen-1-ol
35.576	4.01	8-Hexadecenal, 14-methyl	22.460	1.78	1-octadecyne

**Tabela 1.** Constituintes químicos presentes no OE de *C. sativum* L. identificados por cromatografia gasosa (CG-EM) nos anos de 2019 e 2022. Fonte: autor.





**Figura 10.** Cromatograma do OE de *C. sativum* L. identificados por cromatografia gasosa (CG-EM) no ano de 2022. Fonte: autor.

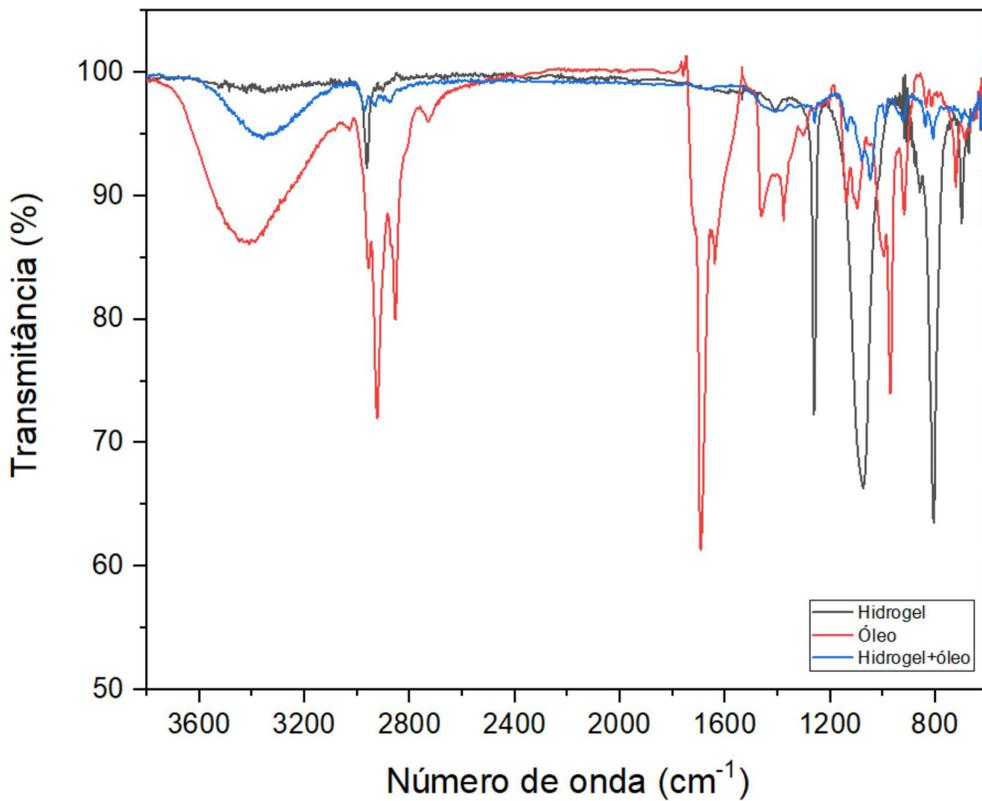
## 5.2 Análise por infravermelho do hidrogel contendo óleo essencial de *C. sativum* L.

A análise por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) fornece informações sobre os grupos funcionais presentes na amostra. Nesse sentido, na figura 11 há a demonstração do gráfico de caracterização estrutural das 3 amostras, sejam elas: óleo essencial de *C. sativum* L, Hidrogel e óleo essencial de *C. sativum* L. incorporado ao hidrogel.

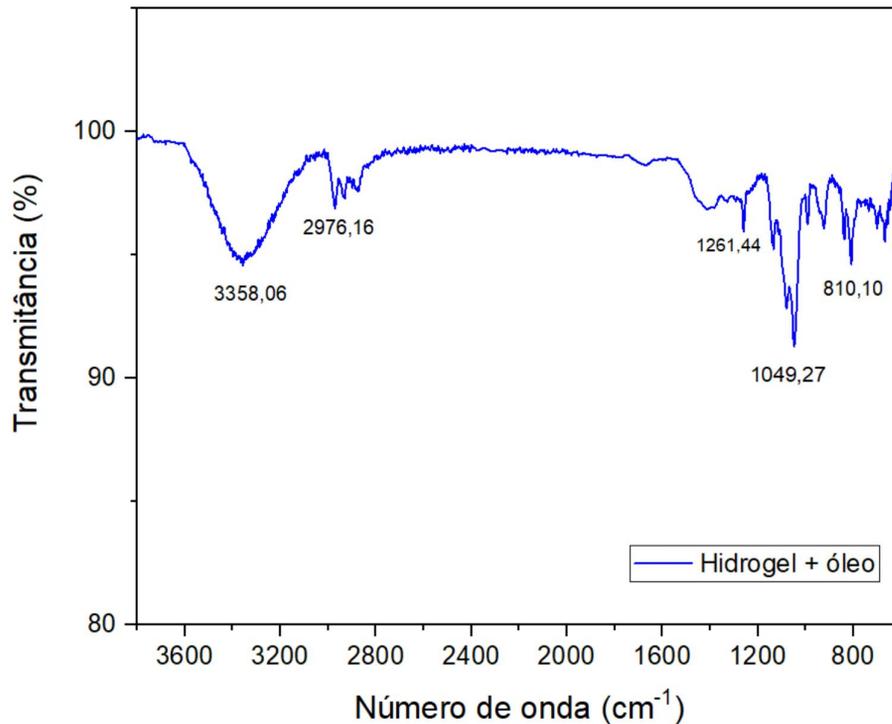
Observando a figura 11, há a correlação entre número de onda e transmitância gerando bandas para cada amostra que estão diferenciadas entre 3 cores. Na representação em cor vermelha é relacionado a amostra de OE de *C. sativum* L., em que percebe-se banda em número de onda entre  $1740\text{ cm}^{-1}$  (C=O) e também  $2800\text{ cm}^{-1}$  (C-O) relacionados a presença de grupo funcional aldeído, além de banda relativa ao grupo funcional álcool na região entre  $1000\text{ cm}^{-1}$ . Outrossim, a amostra de hidrogel representada pela cor preta apresenta banda na região entre  $1070$  e  $1150\text{ cm}^{-1}$  e  $1200$  e  $1275\text{ cm}^{-1}$ , sugerindo a presença de grupo funcional éter alifático e aromático (C-O), principal grupo funcional deste hidrogel.

Demonstra-se que, por meio da correlação dos comprimentos de ondas e seus picos, evidências da incorporação do óleo essencial de *C. sativum* L. ao hidrogel, seja por meio da visualização da perpetuação de bandas na região entre  $3200$  a  $3400\text{ cm}^{-1}$  que estão presentes na amostra do OE e também na amostra do OE incorporado ao hidrogel, e que podem estar relacionados a grupo -O-H, e também se evidencia pela

interação do óleo essencial com as moléculas do hidrogel, sugerido pela presença de bandas representadas pela cor azul, demonstrando que houve uma mudança na intensidade da banda característica de OH ( $3358,06\text{ cm}^{-1}$ ), que pode indicar que as ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas foram as principais ligações não covalentes resultantes da interação entre o polímero e o óleo incorporado, além disso, a banda próximo de  $1050\text{ cm}^{-1}$  demonstra que há presença de grupo funcional álcool, vários dos constituintes do óleo essencial apresentam este grupo funcional.



**Figura 11.** Espectros FTIR das amostras de óleo essencial de *Coriandrum sativum* L. , hidrogel e óleo essencial de *C. sativum* L. incorporado ao hidrogel. Fonte: autor.



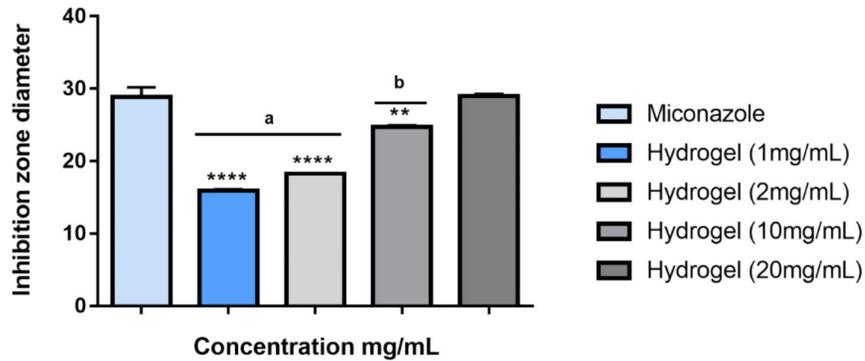
**Figura 12.** Espectros FTIR das amostras de óleo essencial de *C. sativum* L. incorporado ao hidrogel. Fonte: autor.

### 5.3 Ensaio *in vitro*

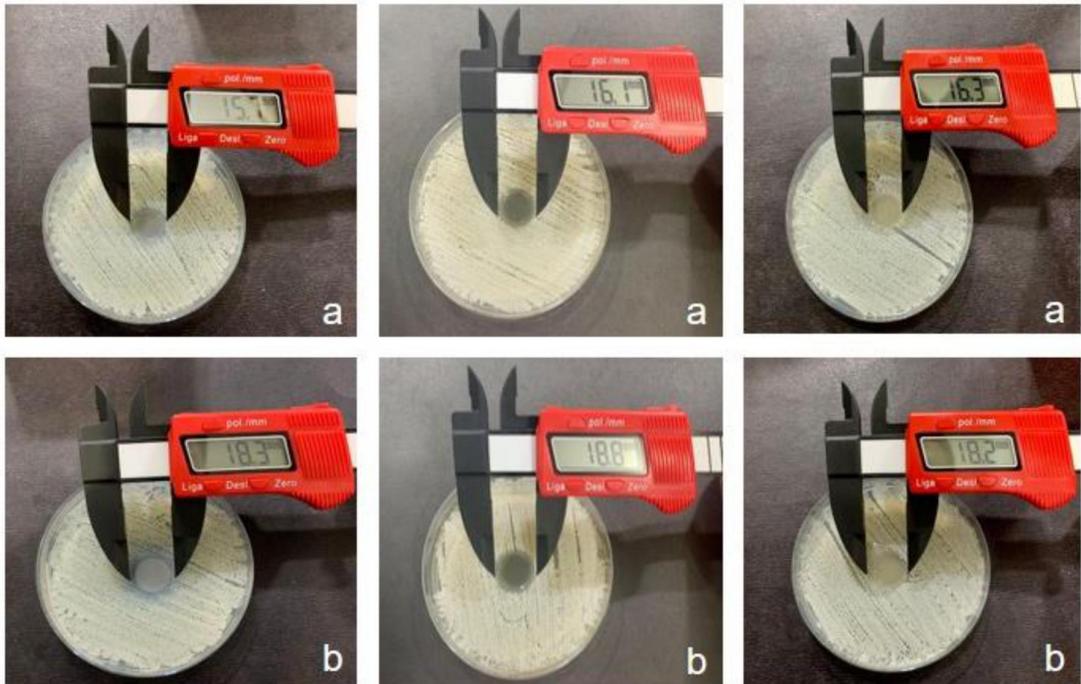
#### 5.3.1 Teste de susceptibilidade fúngica

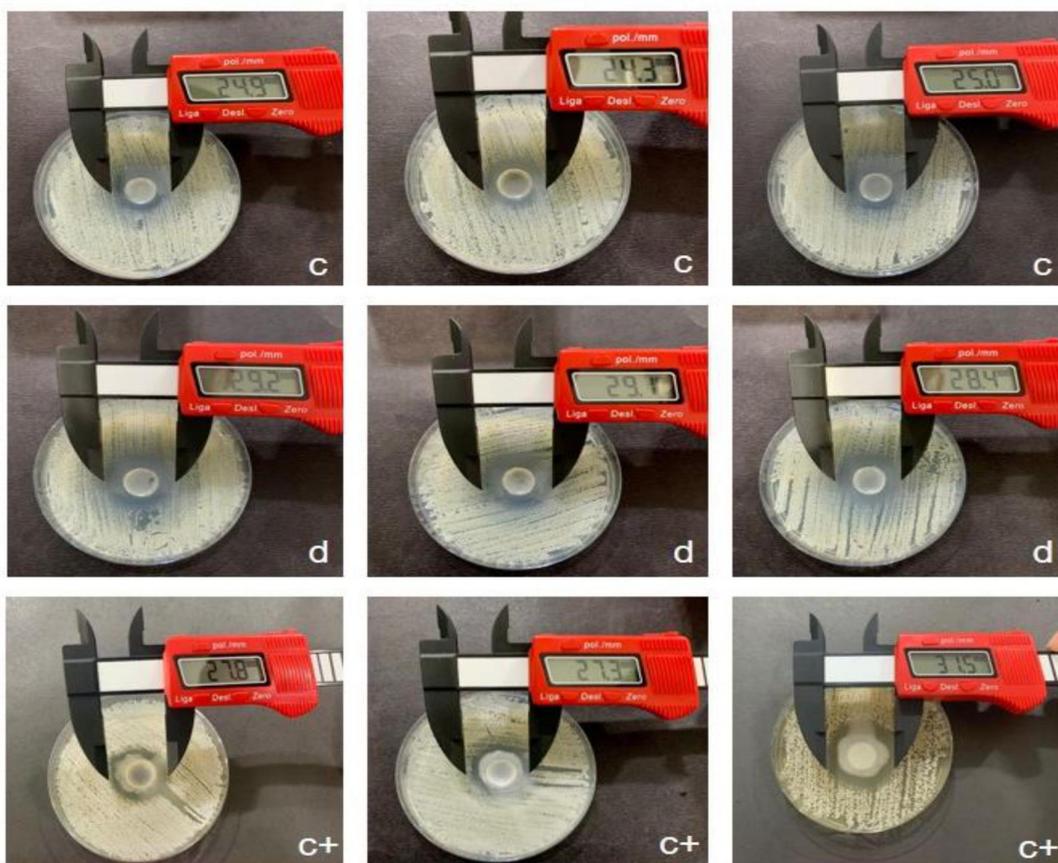
A cepa de *Candida albicans* ATCC 60193 foi exposta a diferentes concentrações do óleo essencial de *C. sativum* L. incorporado ao hidrogel, no qual se verificou o diâmetro do halo de inibição como resposta a sua atividade antifúngica. Inicialmente, as concentrações do OE testadas variaram de 100 µg/mL a 800 µg/mL, no qual o halo de inibição foi inexpressivo, ou seja, não apresentou atividade antifúngica (dados não mostrados). Contudo, nota-se que a formação do halo de inibição é diretamente proporcional à concentração, isto é, quanto maior a concentração, maior será o halo de inibição. Dessa forma, a partir da concentração de 1 mg/mL há a formação de halo de inibição, mas sem diferença estatisticamente significativa com a concentração de 2000 µg/mL (2 mg/mL). Outrossim, na concentração de 20000 µg/mL (20 mg/mL) de óleo essencial de *C. sativum* L. incorporado ao hidrogel já há a formação de expressivo halo de inibição, não havendo,

inclusive, diferença estatística entre a concentração de 20 mg/mL e o controle positivo que é miconazol na concentração 20 mg/g , muito utilizado no tratamento de infecções por fungos do gênero *Candida* na cavidade oral.



**Figura 13.** Gráfico que representa a média  $\pm$  DP de três experimentos independentes realizados em triplicata. Trata-se de um gráfico que fornece o diâmetro da zona de inibição em função da concentração de hidrogel contendo OE de *C. sativum* L. testada (mg/mL). ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey que foi realizada para comparação entre os grupos, \*\*\*\* $p < 0,0001$ , \*\* $p < 0,01$  em relação ao controle positivo (miconazol). <sup>a</sup> $p < 0,0001$  em relação ao controle positivo e <sup>b</sup> $p < 0,01$  em relação ao controle positivo. Fonte: autor.

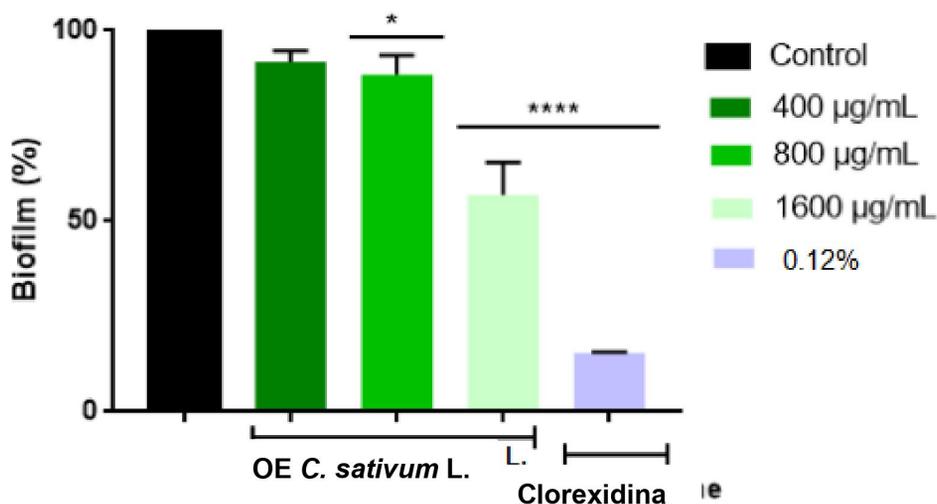




**Figura 14.** Imagem da aferição do diâmetro de halo de inibição dos hidrogéis contendo óleo essencial (OE) de *C. sativum* L. e miconazol por paquímetro digital. \*a (hidrogel na concentração de 1 mg/mL de OE); \*b (hidrogel na concentração de 2 mg/mL de OE); \*c (hidrogel na concentração de 10 mg/mL de OE); \*d (hidrogel na concentração de 20 mg/mL de OE); \*c+ (controle positivo – miconazol gel oral 20 mg/g). Fonte: autor.

### 5.3.2 Estudo do efeito do óleo essencial de *C. sativum* L. sobre a redução de biofilme multiespécie

O OE de *C. sativum* L. e clorexidina foram capazes de reduzir significativamente a atividade metabólica do biofilme multiespécie bucal. O óleo essencial na concentração de 1600  $\mu\text{g/mL}$  foi capaz de reduzir em 37% ( $p < 0,0001$ ) da atividade metabólica do biofilme comparado ao controle negativo, no entanto, trata-se de um efeito dependente da concentração, uma vez que o óleo essencial de *C. sativum* L. na concentração de 800  $\mu\text{g/mL}$  reduziu em 17% ( $p = 0.0291$ ) a atividade metabólica do biofilme comparado ao controle negativo, conforme pode ser visto na figura 15. Já a clorexidina (CHX), foi capaz de reduzir em 84% ( $p < 0,0001$ ) a atividade metabólica do biofilme multiespécie bucal comparado ao controle negativo.



**Figura 15.** Atividade metabólica do biofilme multiespécie bucal tratados com óleo essencial de *Coriandrum sativum* L. nas concentrações de 1600, 800 e 400 µg/mL, clorexidina 0.12% e meio de cultura (controle). O biofilme que corresponde ao controle foi considerado com 100% de atividade metabólica. Os resultados são apresentados como média ± DP de três experimentos independentes realizados em triplicata (ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey, \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ; \* $p = 0.0291$  em comparação com o grupo controle). Fonte: autor.

### 5.3.3 Estudo do efeito do óleo essencial de *C. sativum* L. sobre a micromorfologia de cepa de *C. albicans*

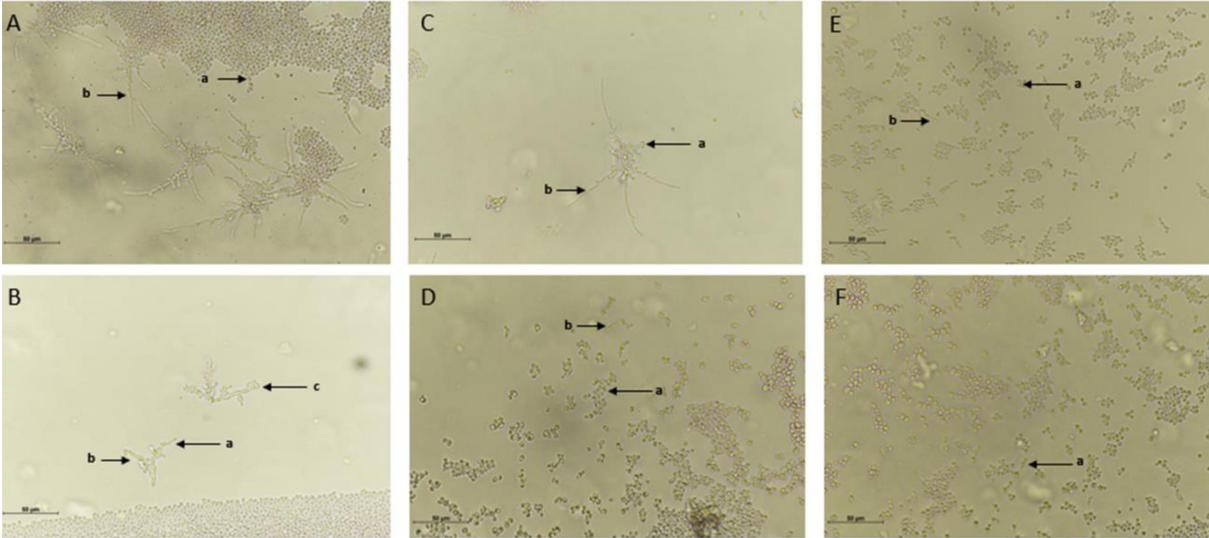
Os resultados do efeito do óleo essencial de *C. sativum* L. e da nistatina sobre as cepas de *C. albicans* ATCC 90028 estão expressos na figura 15. A cepa de *C. albicans* ATCC 90028, em microcultura não tratada (controle), demonstrou micromorfologia característica com presença de blastoconídios, frequentes pseudo-hifas (cerca de 15 pseudo-hifas por campo visual) e raros clamidioconídios (figura 15B).

Contudo, quando *C. albicans* ATCC 90028 cresce no meio contendo o tratamento com óleo essencial de *C. sativum* L. na concentração equivalente a CIM, observa-se desenvolvimento de pseudo-hifas com menor frequência por campo, em média 5 pseudo-hifas por campo visual, conforme pode ser visto na figura 15C, em que não foi observado clamidioconídios. Efeito semelhante foi observado pela nistatina na concentração (CIM), em média 1,5 pseudo-hifas por campo visual, porém além deste efeito observado, a nistatina promoveu mudanças morfológicas nos

blastocónidios de *C. albicans*, tais como: leveduras piriformes, ovóides e com perda de citoplasma, conforme visto na figura 15D.

Apenas na concentração CIMx2 do tratamento com óleo essencial de *C. sativum* L. tais mudanças morfológicas dos blastocónidios são observadas, adicionalmente as pseudo-hifas se mostram raras, visível na figura 15E. Esses efeitos são semelhante a ação da nistatina na sua respectiva concentração CIMx2 (figura 15F).

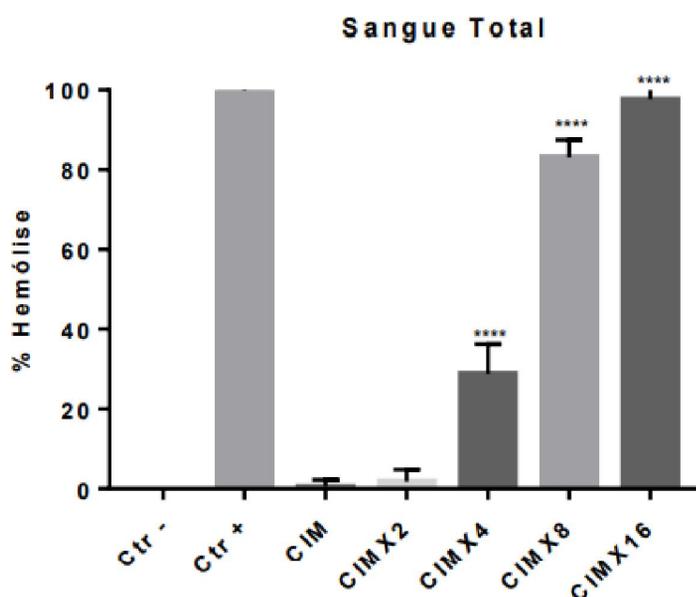
Este fungo na presença da nistatina (controle positivo) apresentou alterações morfológicas dos seus blastocónidios, estes se apresentaram piriformes, ovóides e com perda de citoplasma. Não houve observação de clamidioconidio para a respectiva levedura e as pseudo-hifas foram raras (média de 1,5 pseudo-hifas por campo visual).



**Figura 16.** Imagens representativas de grupos experimentais que contemplam o efeito do óleo essencial de *Coriandrum sativum* L. e da nistatina na micromorfologia de *Candida albicans* ATCC 90028. 15A e 15B controle negativo; 15C tratamento com óleo essencial de *C. sativum* L. a 62.5 µg/mL (CIM); 15D tratamento com nistatina a 1.5 µg/mL (CIM); 15E tratamento com óleo essencial de *C. sativum* L. a 125 µg/mL (CIMx2); 15F tratamento com nistatina a 3 µg/mL (CIMx2); a. blastoconídios. b. pseudohifas. c. clamidioconídios. Bar: 50µm(400x)

### 5.3.4 Citotoxicidade em eritrócitos humanos

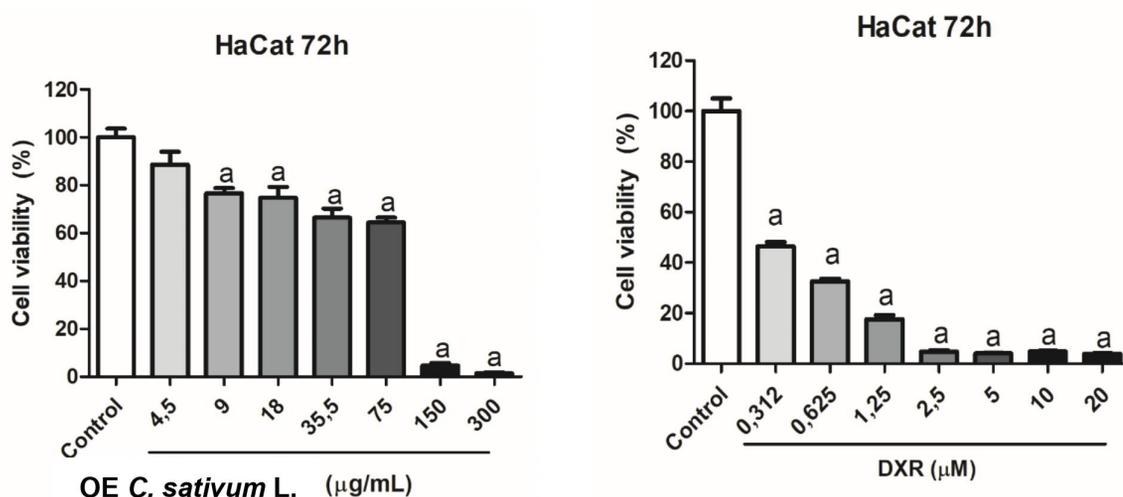
Um dos achados sobre o perfil toxicológico desse OE foi através do ensaio de citotoxicidade *in vitro* do OE de *C. sativum* L. frente aos eritrócitos humanos. Os resultados deste ensaio podem ser visualizados na figura 16. O OE de *C. sativum* L. não promoveu mudanças na viabilidade celular nas concentrações equivalentes à CIM (62,5 µg/mL) e CIMx2 (125 µg/mL) quando comparado ao controle negativo, contudo, em concentrações acima de CIMx4 (250 a 1000 µg/mL) promoveu mudanças na viabilidade celular quando comparado ao controle negativo, com efeito dependente da concentração. Assim, a CH<sub>50</sub>, isto é, o valor da concentração que produz 50% de hemólise de eritrócitos foi considerado maior que CIMx4 (250 µg/mL).



**Figura 17.** Possíveis efeitos citotóxicos do óleo essencial de *Coriandrum sativum* L. contra os eritrócitos humanos com tipo sanguíneo A-, B+, AB+ e O+. Essas amostras de diferentes tipos sanguíneos foram incubadas em diferentes concentrações do óleo essencial de *C. sativum* L. (62,5 – 1000 µg/mL) durante 1h a 37°C, determinando a atividade hemolítica por método colorimétrico. Os gráficos acima representam a média ± DP de três experimentos independentes realizados em duplicata (Oneway ANOVA seguido do pós-teste de Tukey para comparação entre os grupos, sendo \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ). Controle positivo (água Milli Q) e Controle negativo (solução tamponada de PBS). Fonte: autor.

### 5.3.5 Ensaio de citotoxicidade sobre queratinócitos humanos

A possível atividade citotóxica do OE de *C. sativum* L. foi investigada usando queratinócitos da linhagem de células HaCaT. Dessa forma, o óleo essencial de *C. sativum* L. na concentração de 4,5 µg/mL inibiu levemente o percentual de viabilidade celular das células queratinócitos linhagem HaCaT, quando comparado ao controle negativo, que representa 100% de viabilidade celular. Contudo, este óleo essencial nas concentrações de 9 µg/mL, 18 µg/mL, 35,5 µg/mL e 75 µg/mL apresenta moderada inibição da viabilidade celular quando comparado ao controle negativo. Entretanto, o OE de *C. sativum* L. na concentração de 150 e 300 µg/mL causa uma forte inibição da viabilidade celular quando comparado ao controle negativo. Analisando as concentrações e seus efeitos inibitórios frente a viabilidade das células queratinócitos HaCaT, constata-se que trata-se de uma citotoxicidade proporcional ao aumento da concentração do óleo essencial em um perfil concentração-dependente. Esses resultados podem ser visualizados na figura 17.



**Figura 18.** Efeitos do óleo essencial de *C. sativum* L. (4,5 – 300 µg/mL) e DXR\* (0,312 – 20 µM) em diferentes concentrações na viabilidade de células não tumorais HaCat após 72 horas de tratamento. Os resultados são expressos como média ± erro padrão de três experimentos independentes realizados em quadruplicata, testados em diferentes concentrações (µM e µg/mL). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey. <sup>a</sup>p < 0,05 em relação ao controle não tratado. \*DXR: Doxorubicina. Fonte: autor.

Já a tabela 2 contempla informações sobre a concentração que inibe 50% das células (IC<sub>50</sub>) do óleo essencial de *C. sativum* L. e da doxorubicina (fármaco da classe

antraciclina com função antitumoral) que é controle positivo neste ensaio. É notório que o óleo essencial de *C. sativum* L. apresentou menor citotoxicidade sobre as células de queratinócitos, uma vez que a concentração referente a IC<sub>50</sub> da doxorubicina é acima de 100x menor que a concentração referente a IC<sub>50</sub> do óleo essencial, isto é, em baixa concentração a doxorubicina (IC<sub>50</sub> 0.150 ± 0.0005 µg/mL) já causa efeitos inibitórios na viabilidade celular devido seu baixo índice terapêutico, enquanto o óleo essencial de *C. sativum* L. (IC<sub>50</sub> 60.13 ± 2.02 µg/mL) demonstra-se mais tolerável, pois apenas em concentração bem mais elevada em comparação ao controle positivo (doxorubicina) é que ocorrerá a inibição de 50% das células HaCaT.

**Tabela 2.** Atividade citotóxica do OE de *C. sativum* L. e doxorubicina contra a linhagem celular HaCaT.

<b>Amostra</b>	<b>IC<sub>50</sub></b>
OE <i>C. sativum</i> L.	60.13 ± 2.02 µg/mL
Doxorubicina	0.28 ± 0.001 µM

Os dados são apresentados como valores de IC<sub>50</sub> em µM ou µg/mL e seus respectivos intervalos de confiança de 95% obtidos por regressão não linear de pelo menos três experimentos independentes realizados em quadruplicata, medidos pelo ensaio MTT após 72 h de incubação. A doxorubicina foi utilizada como controle positivo.

#### 5.4 Ensaio *in vivo*

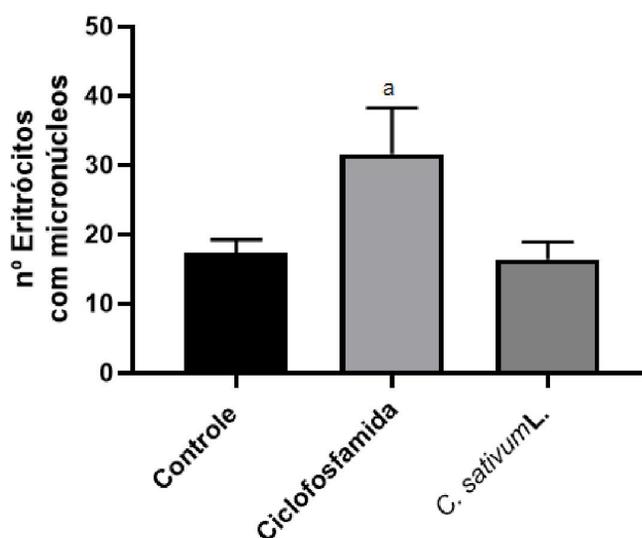
##### 5.4.1 Genotoxicidade

O tratamento dos camundongos com dose única de 20 mg/mL (5 mg/kg) de óleo essencial de *C. sativum* L. não estimulou o aumento do número de eritrócitos micronucleados no sangue periférico (16.40 ± 1.1) quando comparado ao grupo controle negativo (17.40 ± 0.8), ao contrário da ciclofosfamida que é grupo controle positivo (31.60 ± 2.9) que induziu aumento considerável no número de eritrócitos micronucleados em comparação ao grupo controle negativo. Os dados podem ser visto na tabela 3 e na figura 18.

**Tabela 3.** Efeito da administração em dose única do óleo essencial de *C. sativum* L. (20 mg/mL) e ciclofosfamida (50 mg/kg) no número de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos após 48h de tratamento.

Grupos	Dose (mg/kg)	Nº de eritrócitos micronucleados
Controle negativo	-	17.40 ± 0.8
Ciclofosfamida	50	31.60 ± 2.9 <sup>a</sup>
<i>C. sativum</i> L.	5	16.40 ± 1.1

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de cinco animais. Solução salina (controle negativo). <sup>a</sup>p<0.0005 comparado ao grupo controle negativo analisados por ANOVA seguido de Dunnet e Tukey.

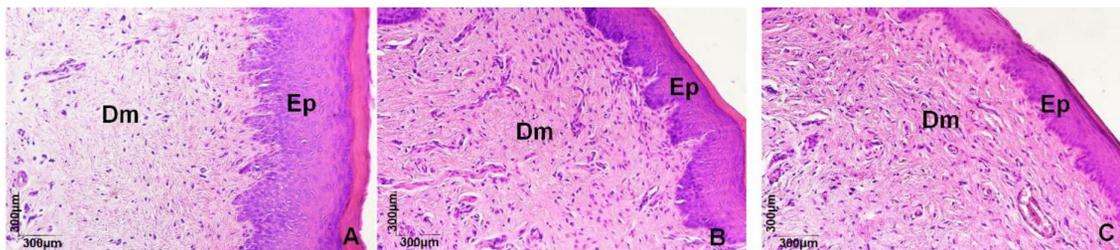


**Figura 19.** Efeito da administração em dose única do óleo essencial de *C. sativum* L. (20 mg/mL) e ciclofosfamida (50 mg/kg) no número de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos após 48h de tratamento.

#### 5.4.2 Estudo de toxicidade em mucosa oral ceratinizada de ratos

Os cortes histológicos provenientes da biópsia excisional do palato duro do animal estão descritas na figura 20, na qual observa-se que a Epiderme (Ep) apresenta queratinócitos em tamanho, forma e distribuição regulares conforme o padrão de normalidade e que a Derme (Dm) apresenta-se com fibras e células de tamanho, forma e distribuição regulares, conforme normalidade em todas as condições experimentais, isto é, para os 3 grupos testados (Hidrogel contendo OE de *C. sativum* L. ; Hidrogel sem OE; Solução salina), corroborando para o perfil de segurança para aplicação em mucosa oral ceratinizada do hidrogel contendo OE de

*C. sativum* L.



**Figura 20.** Corte histológico do palato duro corado em hematoxilina e eosina evidenciado aspectos de normalidade em todas as condições experimentais. A. Grupo Controle negativo (solução salina). B. Hidrogel sem princípio ativo (sem OE). C. Hidrogel contendo óleo essencial de *C. sativum* L. na concentração de 20mg/mL. Legendas: Ep. Epiderme. Dm. Derme. Aumento total de 400x. Fonte: autor.

*Discussão*

## DISCUSSÃO

A candidíase oral é uma condição clínica que para ser debelada requer melhorias no campo da higiene oral, supressão de fatores predisponentes e uso de terapia medicamentosa antifúngica. Contudo, há algumas problemáticas relacionada aos fármacos da classe dos antifúngicos, entre elas: mecanismos de resistência fúngica a esses fármacos, pequeno arsenal de fármacos disponíveis restritos a três classes e crescente prevalência de infecções fúngicas graves relacionadas a indivíduos imunocomprometidos, portadores de HIV, câncer e idosos (LEE et al., 2020).

Dessa forma, o cenário atual relacionado ao tratamento da candidíase oral fomenta a pesquisa de novos agentes com atividade antifúngica, e baseado nessa premissa, estudos anteriores demonstram a atividade antifúngica em estudo *in vitro* do óleo essencial de *C. sativum* L. (BARBOSA et al., 2020), ratificando as hipóteses presentes nesse estudo, que propõem o desenvolvimento de uma formulação farmacêutica usando este OE como princípio ativo para tratamento de infecções fúngicas na cavidade oral e verificação do perfil toxicológico deste produto.

Inicialmente, é necessário verificar os constituintes químicos presentes no OE de *C. sativum* L. através da técnica de cromatografia gasosa (CG-EM), uma vez que é crucial para determinação do controle de qualidade e pureza dos constituintes voláteis que estão presentes neste OE. (RASHEED et al., 2021).

Os constituintes presentes no OE de *C. sativum* L. oriundos de outras pesquisas apresentam similaridade de perfil fitoquímico quando comparado ao OE de *C. sativum* L. utilizado nesse estudo, confirmando a sua pureza, conforme pode ser demonstrado: 3-hexen-1-ol (1.24%), alpha-pinene (0.15%), decanal (10.97%), 2-decenal (2.74%), 2-decen-1-ol (4.11%), 1-decanol (15.30%), undecanal (2.20%), 2-dodecenal (8.16%), tetradecanal (1.26%) (FURLETTI et al., 2011); decanal (11.04%), 1-decanol (17.85%), undecanal (1.40%), dodecanal (4.76%), trans-2-dodecen-1-ol (7.87%), tetradecanal (1.08%) (FOUDAH et al., 2021); alpha-pinene (1.9-2.5%), decanal (5.1-8.8%), 2-dodecenal (12-14%), 1-decanol (5-10%), 2-decenal (20-35%), linalool (0-13%) (AL-KHAYRI et al., 2023); nonane (0.42%), decanal (2.14%), 1-decanol (8.20%), undecanal (0.43%), tetradecanal (3.38%), 2-decen-1-ol (17.01%), tetradecanal (1.35%) (GURNING; SIMANJUNTAK; PURBA, 2020); nonane (0.51%), alpha-pinene (1.90%), decanal (1.73%), 2-decen-1-ol (5.45%), 1-decanol (2.18%),

linalool (13.97%), undecanal (2.43%), dodecanal (4.07%) (SHAHWAR et al., 2012).

Observa-se que há variações na área (%) entre os constituintes em comum do óleo essencial extraído das folhas de *C. sativum* L. do presente estudo e dos demais estudos citados anteriormente, essas diferenças de porcentagem de constituintes químicos do óleo essencial em diferentes amostragens acontecem devido diversos fatores, tais como: alterações no local produtivo relacionadas ao solo, clima, altitude, irrigação, região geográfica, método extrativo, coleta das folhas em diferentes estágios de crescimento da planta e até mesmo, fertilizantes utilizados (AL-KHAYRI et al., 2023). Contudo, vale salientar que, apesar dos constituintes químicos apresentarem diferenças percentuais entre si, os componentes minoritários também são importantes para a bioatividade do óleo essencial, uma vez que, a bioatividade antifúngica está relacionada a um efeito sinérgico entre a combinação dos diversos constituintes químicos, na maioria das vezes, o uso do óleo essencial com a preservação de todos os seus constituintes se mostra mais bioativo do que a utilização apenas dos constituintes majoritários juntos (DHIFI et al., 2016).

Como observado por Mabrouk et al. (2022) a banda em  $1411,89\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída às ligações de estiramento -C-O-C- (MABROUK et al., 2022). Já a banda  $2962,66\text{ cm}^{-1}$  atribuída ao estiramento de hidrogênio C-H e a  $1076,27\text{ cm}^{-1}$  atribuída a C-O (EL FAWAL et al., 2018).

Bandas características do óleo essencial da folha de *C. sativum* (em vermelho): banda larga de OH em  $3410,14\text{ cm}^{-1}$ , as bandas em  $2924,08\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas as vibrações C-H de alcanos e estiramentos N-H – padrões similares encontrados por Yashni et al. (2021). Assim, a banda fina e evidente em  $1693,50\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída as amidas de proteínas e enzimas presentes na folha e as bandas em  $1462,04\text{ cm}^{-1}$  e  $1377,17\text{ cm}^{-1}$  devido a presença de álcoois terciários (C-OH) (YASHNI et al., 2021). As bandas em  $970,19\text{ cm}^{-1}$  vibrações de estiramento C-O de ácidos carboxílicos (-COOH) e  $723,30\text{ cm}^{-1}$  ao alongamento de haletos de alquila (SHARMA et al., 2018).

Em um outro estudo que submeteu óleo essencial de *C. sativum* L. ao mesmo método, houve fortes vibrações, como também foi visto no espectro da figura 11, neste estudo também demonstraram banda aproximadamente em  $2900\text{ cm}^{-1}$  relacionada a ligação CH<sub>2</sub> assimétrica e banda em aproximadamente  $1730\text{ cm}^{-1}$ , algo que também foi visto na figura 11, relacionado a presença de carbonila (C=O) (64). Além disso, mais um estudo envolvendo óleo essencial de *C. sativum* L. também se verificou

bandas na região de  $1462\text{ cm}^{-1}$  devido mistura de alcanos e  $919\text{ cm}^{-1}$  relacionado a ligação  $\text{-C-H}$  de alcenos, além de banda com pico de grande intensidade em  $1742\text{ cm}^{-1}$  relacionado a grupo éster. (SHRIRAME et al., 2018).

Enquanto as bandas presentes no espectro do hidrogel incorporado pelo óleo da folha de *C. sativum* (em azul) são relativas à mudança na intensidade da banda característica de OH ( $3358,06\text{ cm}^{-1}$ ) que pode indicar que as ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas foram as principais ligações não covalentes resultantes da interação entre o polímero e o óleo incorporado. Os autores observaram algo similar ao incorporar óleos essenciais de eucalipto, cominho e gengibre em seus hidrogéis (WANG et al., 2021). Houve uma redução da intensidade da banda em  $1261,44\text{ cm}^{-1}$  no espectro do hidrogel incorporado com o óleo e que foi observada no espectro do hidrogel (sem adição do óleo). Outrossim, o polímero utilizado no hidrogel do nosso estudo também já foi demonstrado pico de adsorção em  $1600$  e  $1049\text{ cm}^{-1}$  que é relacionado à vibração de ligação  $\text{-CH}$  e alongamento  $\text{-C-O}$  (NING et al., 2021). Além disso, a pouca demonstração de picos na amostra de OE de *C. sativum* L. incorporado ao hidrogel pode se explicar pelas limitações do método FT-IR, relacionado a detecção de compostos químicos apenas em concentração acima de 5% (GANDOVA et al., 2020).

As formulações farmacêuticas do tipo hidrogel são novos sistemas de liberação de fármacos e que podem ser usadas para conter princípios ativos que sejam direcionados ao uso na mucosa oral, uma vez que apresentam propriedades relacionadas a mucoadesividade, liberação sustentada, sensação agradável e segurança, representando melhor adesão do paciente, viscoelasticidade, isto é, quando viscoso e elástico está apropriado para uso na mucosa oral, excelente espalhabilidade, além da fácil remoção após aplicação. Os hidrogéis tem a característica de apresentar grande percentual de água (70-99%) em sua composição, sendo a água conhecida como a fase líquida externa. Esse tipo de formulação é um polímero hidrofílico com redes tridimensionais de agentes gelificantes, de forma que a fase aquosa fique íntegra e na conformação ideal através de uma rede polimérica. (GHASEMIYEH; MOHAMMADI-SAMANI, 2019; NAGAI; MACHIDA, 1993; ZHENG et al., 2021; WRÓBLEWSKA et al., 2020). Essas características foram decisivas para a escolha de qual formulação farmacêutica seria promissora para incorporação do óleo essencial de *C. sativum* L.

Nesse sentido, o óleo essencial de *C. sativum* L. apresenta atividade

antifúngica, como já foi mencionado na fundamentação teórica, mas há também outras maneiras de se avaliar a atividade antifúngica, dentre elas o teste de susceptibilidade por meio de halo de inibição, que serve como método de sensibilidade simples e confiável em que se verifica o tamanho do crescimento fúngico ao redor da substância e o halo de inibição será mensurado em milímetros (mm). Assim, o OE de *C. sativum* L. apresentou halo de inibição frente ao crescimento fúngico de cepas do gênero *Candida* em outros estudos, variando de 9 a 10 mm na concentração de 10000 µg/mL (10 mg/mL) (SOARES et al., 2012). No presente estudo, o OE de *C. sativum* L. apresentou halo de inibição para cepa de *Candida albicans* variando de 24.3 a 25.0 mm com o hidrogel contendo OE de *C. sativum* L. na concentração de 10000 µg/mL (10 mg/mL). Já hidrogéis contendo anfotericina B como proposta para revestir superfície para dispositivos apresentaram excelente atividade contra *Candida albicans* (SALOMÉ VEIGA; SCHENEIDER, 2013). Além disso, outro estudo propôs também a prospecção de um produto natural para incorporação em uma formulação do tipo hidrogel, trata-se do hidrogel de metilcelulose com óleo essencial de *Melissa officinallis* para tratamento de candidíase oral, no qual apresentou atividade antifúngica contra cepa de *C. albicans*, com halo de inibição em torno de 17 mm na concentração de 2% (v/v) *M. officinallis* (SERRA et al., 2020).

O ambiente que compõe a cavidade bucal está susceptível à infecções fúngicas, mas também infecções por bactérias e até mesmo a formação de biofilmes, visto que a boca pode ser hábitat de até 700 tipos diferentes de bactérias. Um biofilme é caracterizado por ser uma comunidade de diversas bactérias orais colônias, matriz extracelular e organizada comunicação celular. Após a formação do biofilme, o hospedeiro fica mais susceptível ao desenvolvimento de doenças que afetem a saúde bucal, sobretudo, periodontite. Dessa maneira, a prospecção de agentes antimicrobianos que possam inibir ou interromper a formação de biofilme são preconizados para inserção na rotina de higiene oral. Um exemplo é o gluconato de clorexidina (CHX) que é um antisséptico conhecido por ser agente antimicrobiano com atividade contra bactérias Gram positivas e Gram negativas (KOLENBRANDER et al., 2010; SOLMAZ; KORACHI, 2013).

Este estudo também objetivou verificar a atividade do óleo essencial de *C. sativum* L. em modelo de biofilme multiespécie bucal, visto que outrora era um dado indisponível, uma vez que não há estudos que relacionem este OE à atividade metabólica em biofilme multiespécie bucal. Contudo, este óleo essencial apresenta

atividade antimicrobiana *in vitro* contra *Streptococcus mutans* com CIM entre 31.2 à 62.5 µg/mL em células planctônicas. (FREIRES et al., 2015). Outro estudo verificou que o OE de *C. sativum* L. apresentou CIM abaixo de 0.500 mg/mL em modelo de biofilme com bactérias, como *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus sanguinis* e *Streptococcus mitis*, já na concentração de 1 mg/mL a porcentagem de inibição do biofilme foi de 1.50% para *S. Mitis* e de 58.33% para *S.sanguinis*. (BERSAN et al., 2014). Uma fração do OE de *C. sativum* L. (Cs<sub>4</sub>) na concentração de 31.2 µg/mL foi capaz de inibir mais de 90% da formação de biofilme de *S. mutans* (GALVÃO et al., 2012). Além disso, pode-se comparar a atividade do OE de *C. sativum* L. com outras substâncias, como o extrato de propólis vermelha brasileira, que na concentração de 1600 µg/mL foi capaz de reduzir em 56% a atividade metabólica de biofilme multiespécie formado de espécies de bactérias similares a usadas no nosso estudo (DE FIGUEIREDO et al., 2020). Por conseguinte, este estudo apresentou 37% de redução da atividade metabólica de biofilme multiespécie quando utilizado o OE de *C. sativum* L. na concentração de 1600 µg/mL, representando um resultado que pode agregar mais um benefício para saúde bucal, isto é, redução de formação de biofilme e menor risco de desenvolvimento de periodontites, quanto ao uso deste OE na cavidade oral.

A virulência de fungos patogênicos, como os do gênero *Candida* pode estar relacionada a alterações morfológicas na levedura ou forma filamentosa, com formação de hifas e pseudo-hifas, além do clamidósporo (clamidioconídio) que se forma na extremidade final da hifas em condições pobres de nutrientes. Vale salientar que, a morfologia comum de *C. albicans* é composta por pseudo-hifas e hifas, e apenas nesta espécie se visualiza os clamidioconídios. Outrossim, o desenvolvimento de hifas, por exemplo, está intimamente relacionado com a multiplicação e disseminação do fungo no organismo, seja pela invasão às células epiteliais com sua força mecânica e penetração tanto de células epiteliais quanto células endoteliais e lise de macrófagos e neutrófilos, além do tigmotropismo relacionados à capacidade das hifas encontrarem orifícios e locais fragilizados no tecido para promover a infecção (THOMPSON; CARLISLE; KADOSH, 2011).

Em um estudo foi visto a influência do óleo essencial de *C. sativum* L. em concentração de CIM e CIMx2 na micromorfologia de uma cepa de *C. albicans* ATCC 76485 e uma cepa de *C. albicans* LM 336 (isolada de fezes humanas). Para ambas as cepas o valor da CIM do óleo essencial de *C. sativum* L. foi de 512 µg/mL, em que

observou-se redução de pseudo-hifas com alterações morfológicas semelhantes as provenientes do tratamento com nistatina (CIM), no nosso estudo, houve redução de pseudo-hifas de *C. albicans* ATCC 90028 a partir da concentração de 62.5 µg/mL (CIM) (SOUSA et al., 2016). Dessa forma, as estruturas morfológicas são indícios de infecção fúngica e a diminuição dessas estruturas após o tratamento com o óleo essencial de *C. sativum* L. em concentrações referentes à CIM e CIMx2 está relacionada à bioatividade antifúngica deste produto natural e seu efeito na redução da virulência fúngica.

Além da determinação da bioatividade antifúngica e antimicrobiana do óleo essencial de *C. sativum* L., também é importante verificar o perfil toxicológico dessa substância. Atualmente, já há a consolidação de diversos estudos pré-clínicos no desenvolvimento de fármacos, principalmente relacionado a estudos de segurança *in vivo*, que são preconizados pela OECD na toxicologia investigativa. Contudo, cada vez mais há o consenso de se incorporar novas estratégias de triagem toxicológicas, principalmente, utilizando modelos *in vitro* humanizados. Os resultados de ensaios toxicológicos melhoram as decisões pré-clínicas, evitando desfechos inseguros em ensaios clínicos envolvendo seres humanos, visto essa ser uma problemática recorrente na prospecção de novos fármacos (BEILMANN et al., 2019).

Dessa forma, este estudo propôs a realização de testes toxicológicos *in vitro*, e posteriormente, ensaios toxicológicos usando modelos *in vivo*, uma vez que estes continuam representando o padrão-ouro de modelo preditivo de riscos toxicológicos em vertebrados (MODARRESI CHAHARDEHI; ARSAD; LIM, 2020). Assim, para extrapolar os ensaios toxicológicos para um ensaio clínico em seres humanos, faz-se necessário reunir informações em diferentes modelos toxicológicos investigativos, perpassando ensaios *in vitro* e *in vivo*, de forma a garantir a segurança dos participantes de um possível ensaio clínico utilizando hidrogel com óleo essencial de *C. sativum* L. Vale salientar que, o OE de *C. sativum* L. foi reconhecido pela Food and Drug Administration (FDA) como geralmente seguro como agente aromatizante e coadjuvante, outrossim, estudos toxicológicos envolvendo esse óleo são escassos devido ao histórico de consumo sem efeitos tóxicos relevantes (BURDOCK; CARABIN, 2009).

Um dos ensaios toxicológicos *in vitro* utilizados na pesquisa de produtos naturais com atividade antifúngica é o estudo toxicológico a nível de eritrócitos humanos, que mimetiza os riscos de efeitos tóxicos de uma substância em células

humanas, visto que os eritrócitos são as células mais abundantes no corpo e dispõem de características fisiológicas e morfológicas que propiciam o uso destas células como modelo investigativo de hemólise. (RAJESHWARI; SHOBHA; ANDALLU, 2012). Um estudo utilizando óleo essencial de *C. sativum* L. obtido de partes aéreas da planta verificou que o óleo é capaz de lisar a membrana celular dos eritrócitos, visto que a sua atividade hemolítica foi 2,3 mg/mL (IC<sub>50</sub>) , relacionando essa citotoxicidade a presença de constituintes do óleo essencial, tais como álcoois e aldeídos (SHAROPOV et al., 2017). De fato, neste estudo também se verificou que o OE de *C. sativum* em concentrações a partir de CIMx4 (250 a 1000 µg/mL) foi capaz de causar mudanças na viabilidade celular dos eritrócitos quando comparado ao controle negativo, com efeito dependente da concentração, mas os demais testes toxicológicos podem complementar o perfil toxicológico deste produto, a fim de garantir a segurança em um possível ensaio clínico.

Os queratinócitos humanos imortalizados da pele (HaCaT) abrangem um modelo *in vitro* para ensaio de citotoxicidade mimetizando o epitélio, vale salientar que esse modelo de cultura de célula pode ser aprimorada cultivando-a em fibroblastos gengivais, simulando ainda mais as condições da mucosa oral, contudo, trata-se de um modelo de excelente aplicabilidade devido sua reprodutibilidade em laboratório e podem ser considerados substitutos dos queratinócitos orais (GURSOY et al., 2010; LÓPEZ-GARCÍA et al., 2014; MOHARAMZADEH et al., 2007). Outrossim, a mucosa oral é formada por epitélio oral, ou seja, a proposta desse ensaio foi de estimar possíveis efeitos citotóxicos do óleo essencial de *C. sativum* L. em cultura de células de queratinócitos (HaCaT), levando em consideração um modelo que na sua essência reproduz as condições das células epiteliais.

Em um estudo simularam toxicidade induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> às células HaCaT e usou-se o extrato de *C. sativum* L. proporcionando efeito protetor contra estresse oxidativo a estas células em concentrações de 20 a 500 µg/mL (PARK et al., 2012), essa informação pode fornecer um indício sobre a melhor tolerabilidade do óleo essencial de *C. sativum* L. quando comparado ao controle positivo (doxorrubicina) deste estudo.

Além disso, outro estudo utilizando o óleo essencial de *C. sativum* L. verificou um parâmetro intitulado por Total Growth Inhibition (TGI) que é a inibição total de crescimento contra células humanas e linhagens de células tumorais, com os seguintes resultados: Glioma (U251) de 8.3 µg/mL ; Rim (786-0) de 29.8 µg/mL;

próstata (PC-3) e, especialmente, queratinócitos (HaCaT) com TGI de 129.4 µg/mL e a fração ativa do óleo essencial Cs<sub>4</sub> de 145.6 µg/mL, apresentando atividade antiproliferativa contra algumas linhagens de células (GALVÃO et al., 2012). Outras linhagens celulares também já foram testadas utilizando o óleo essencial de *C. sativum* L, tais como: linha celular imortalizada de células de adenocarcinoma colorretal humano (Caco-2) com IC<sub>50</sub> de 86.8 µg/mL, células de linfoblastos T humanos isolados do sangue periférico (CCRF-CEM) com IC<sub>50</sub> de 16.5 µg/mL (SHAROPOV et al., 2017).

A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo para redução de viabilidade células de queratinócitos (HaCaT), visto que é um fármaco com atividade antitopoisomerase e as células HaCaT apresentam alto nível de atividade da topoisomerase I, por isso se justifica seu uso neste ensaio (PESSINA et al., 2001). Os resultados dos diversos estudos anteriormente citados demonstram que o OE de *C. sativum* L. apresenta perfil antiproliferativo para algumas linhagens celulares, mas com base nos resultados descritos nesta dissertação, o OE de *C. sativum* L. (IC<sub>50</sub> 60.13 ± 2.02 µg/mL) demonstra-se mais tolerável que a doxorrubicina (IC<sub>50</sub> 0.150 ± 0.0005 µg/mL), se consolidando como um produto sem atividade citotóxica pronunciada, corroborado pelo seu efeito protetor contra estresse oxidativo a células HaCaT (PARK et al., 2012).

O ensaio de genotoxicidade é exigido pelas agências regulatórias, à exemplo da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), como requisito para desenvolvimento de medicamentos, já que esse teste abrange ensaios *in vitro* ou *in vivo* fornecendo previsão de efeitos mutagênicos ou capacidade de promover alterações cromossômicas. Um dos testes aceitos para demonstrar o perfil genotóxico de uma substância é através da genotoxicidade *in vivo* em tecido hematopoiético, tratando-se do ensaio que contempla a contagem de eritrócitos policromáticos micronucleados conhecidos também como corpos de Howell-Jolly, que foi realizado neste estudo. Dessa forma, o aumento do número de micronúcleos indica dano cromossômico, algo que pode ser visto com o uso de ciclofosfamida (controle positivo). Esses micronúcleos surgem a partir de rupturas cromossômicas (clastogênese) ou ruptura do aparelho mitótico (aneugênese). (ARALDI et al., 2015; GRISOLIA, 2002).

Estudos relatam que a toxicidade oral aguda composta pela DL<sub>50</sub> (dose letal mediana) em ratos do óleo essencial de *C. sativum* L. é de 4,13 g/kg. Já o extrato de

*C. sativum* L. em concentração de 1020 mg não apresentou genotoxicidade em células de fibroblastos de embrião de rato. O óleo essencial de *C. sativum* L. não foi clastogênico no teste de aberração cromossômica *in vitro* usando linhagem celular de fibroblastos Ch1 provenientes de hamster chinês. Além disso, na literatura há disponível estudo *in vivo* com o ensaio de micronúcleos em camundongos utilizando o linalool, um dos componentes do óleo essencial de *C. sativum* L., em que não houve aumento da ocorrência de eritrócitos policromáticos micronucleados (BURDOCK; CARABIN, 2009).

Outro estudo verificou o efeito do extrato de *C. sativum* L. em concentrações que variaram de 500 a 1500 mg/kg em ensaio de micronúcleos em camundongos associado a ciclofosfamida para induzir a formação de micronúcleos, esta associação objetivou mostrar a atividade do extrato frente a inibição na formação de micronúcleos pela ciclofosfamida, no qual foi demonstrado que o extrato de *C. sativum* L. apresentou uma resposta dose-dependente na inibição da formação de micronúcleos, e que estas doses do extrato não foram citotóxicas para os eritrócitos, sugerindo o extrato de *C. sativum* L. como um provável agente anti-mutagênico (CHANDRAKAR; RAJA, 2018).

Estes resultados advindos de outros estudos que demonstram ausência de atividade genotóxica envolvendo diferentes amostras relacionadas a *C. sativum* L. estão de acordo com o que foi visto em nosso estudo, uma vez que o óleo essencial de *C. sativum* L. na dose de 5 mg/kg não induziu aumento da ocorrência de eritrócitos policromáticos micronucleados em comparação ao controle negativo, assim pode-se inferir que este óleo essencial na dose testada não apresenta efeito genotóxico no sistema hematopoiético (BURDOCK; CARABIN, 2009).

Alguns estudos realizaram testes de avaliação da capacidade de irritação à pele por exposição ao OE de *C. sativum* L., na qual verificou-se que este OE se apresentou irritante para pele de coelhos, contudo o linalool, um dos constituintes majoritários deste OE, além do próprio OE não foram capazes de causar irritação em testes com a pele humana (BURDOCK; CARABIN, 2009). Esses resultados em humanos corroboram com os encontrados no presente estudo, uma vez que o hidrogel contendo OE de *C. sativum* L. não provocou características inflamatórias no palato duro dos animais tratados. Em consonância a isso, testes com uso tópico do extrato de *C. sativum* L. apresentaram capacidade anti-inflamatória com redução de edema de orelha em camundongos e redução do volume de edema inflamatório induzido pela injeção intrapleural de carragenina, entretanto, o OE de *C. sativum* L. não apresentou

atividade anti-inflamatória tópica sobre os parâmetros em que o extrato foi analisado, neste sentido, o autor se evidencia a baixa absorção tópica do óleo como sendo uma barreira para a demonstração de possíveis efeitos anti-inflamatórios, mas que o linalool apresenta bioatividade anti-inflamatória sistêmica (ZANUSSO-JÚNIOR et al., 2011).

## 7 CONCLUSÕES

O óleo essencial de *C. sativum* L. utilizado nos ensaios apresentou componentes químicos majoritários já conhecidos para esta espécie vegetal, além de ter sido sugerido que houve a incorporação do OE à formulação hidrogel vista através de alterações nas bandas e preservação de picos do espectro de infravermelho. A atividade antifúngica contra *Candida albicans* do hidrogel contendo óleo essencial de *C. sativum* L. foi confirmada, demonstrando halo de inibição similar ao de miconazol (antifúngico padrão). Ademais, o óleo essencial apresentou capacidade de alterar a micromorfologia de *Candida* e também é capaz de reduzir a atividade metabólica de biofilme multiespécie bucal. Outrossim, apresentou citotoxicidade para eritrócitos humanos, contudo se demonstrou bem tolerável quando utilizando em tratamento em células de queratinócitos da linhagem HaCaT. Em modelo com animais (*in vivo*), o OE não se destacou como genotóxico na dose única testada, e no teste de segurança em ratos, não apresentou indicações de processos inflamatórios em mucosa oral ceratinizada de animais. Em suma, com base nesses resultados demonstra-se que o hidrogel é promissor para ser introduzido na terapia antifúngica, visto sua notável bioatividade antifúngica e perfil toxicológico seguro, ainda assim é necessário a continuidade de mais ensaios toxicológicos e realização de ensaios clínicos de fase I e II com o propósito de consolidar o hidrogel com OE de *C. sativum* L. como opção terapêutica no tratamento de infecções fúngicas do gênero *Candida*.

## 8 REFERÊNCIAS

ALAMON-REIG, F.; RIZO-POTAU, D.; RIQUELME-MC LOUGHLIN, C. Candidal intertrigo resistant to oral antifungals. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 46, n. 6, p. 1123-1124, 2021.

AL-KHAYRI, J. M.; BANADKA, A.; NANDHINI, M.; NAGELLA, P. et al. Essential Oil from *Coriandrum sativum*: A Review on Its Phytochemistry and Biological Activity. **Molecules**, v. 28, n. 2, p. 696, 2023.

ÁLVARES, C. A.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 5, p. 319-327, 2007.

ALVES, D. N. et al. 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 de Doutorado. Universidade Federal da Paraíba, 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**, v. 71, n. 3-4, p. 965-971, 2013.

AN, R.; RAFIQ, N. B. Candidiasis. StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL) 2020.

ARALDI, R. P.; DE MELO, T. C.; MENDES, T. B.; DE SÁ JÚNIOR, P. L. et al. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 72, p. 74-82, 2015.

ATANASOV, A. G.; ZOTCHEV, S. B.; DIRSCH, V. M.; SUPURAN, C. T. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nature reviews Drug discovery**, v. 20, n. 3, p. 200-216, 2021

BAJUNAID, S. O.; BARAS, B. H.; WEIR, M. D.; XU, H. H. Denture acrylic resin material with antibacterial and protein-repelling properties for the prevention of denture stomatitis. **Polymers**, v. 14, n. 2, p. 230, 2022.

BARBOSA, D. H. X. Análise da atividade antifúngica e perfil fitoquímico do óleo essencial de *Coriandrum sativum* L. (coentro) frente a cepas de *Candida* spp. Trabalho de conclusão de curso. 2021.

BARBOSA, D. H. X. et al. *Coriandrum sativum* L. essential oil obtained from organic culture shows antifungal activity against planktonic and multi-biofilm *Candida*: Antifungal activity of *C. sativum* L. against *Candida*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, 2023.

BEILMANN, M.; BOONEN, H.; CZICH, A.; DEAR, G. et al. Optimizing drug discovery by investigative toxicology: current and future trends. **ALTEX-Alternatives to animal experimentation**, v. 36, n. 2, p. 289-313, 2019.

BERSAN, S. M.; GALVÃO, L. C.; GOES, V. F.; SARTORATTO, A. et al. Action of essential oils from Brazilian native and exotic medicinal species on oral biofilms. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, p. 1-12, 2014.

BHATTACHARYA, S.; SAE-TIA, S.; FRIES, B. C. Candidiasis and mechanisms of antifungal resistance. **Antibiotics**, v. 9, n. 6, p. 312, 2020.

BORGES, C. A.; CASTANHEIRA, J. D.; DE OLIVEIRA ANDRADE, C. M.; MARTINS, L. H. B. et al. Diagnóstico e formas de tratamento da candidíase oral: uma revisão de literatura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 15, p. e359101523123-e359101523123, 2021.

BORGES, L. P.; AMORIM, V. A. Metabólitos secundários de plantas secondary plant metabolites. **Revista Agrotecnologia, Ipameri**, v. 11, n. 1, p. 54-67, 2020.

BRANDÃO, G. R.; DE SOUZA, B. H.; MARTINS, M. R.; DE SOUZA, Y. G. et al. Avaliação da germinação de semente de coentro (*Coriandrum sativum* L.) Em laboratório e bandeja. **Brazilian Journal of Development**, p. 55662-55667, 2022.

BRASILEIRO, C.T.D.; MARQUES, F.M.D.V.V.; DA SILVA SENA, C.; DE SOUSA PEREIRA, M. et al. PROSTHETIC STOMATITIS: DEVELOPMENT, DIAGNOSIS, TREATMENT AND PREVENTION-A LITERATURE REVIEW. **Health and Society**, v. 2, n. 04, p. 149-170, 2022.

BRIDGEMOHAN, P.; BRIDGEMOHAN, R. S.; MOHAMMED, M.; DEITCH, M. et al. Comparative analysis of the odorants of cilantro (*Coriandrum sativum* L.) and culantro (*Eryngium foetidum* L.) as aromatic crop mimics of family: Apiaceae. **Journal of Horticulture and Postharvest Research**, v. 4, n. 4, p. 479-496, 2021

BURDOCK, G. A.; CARABIN, I. G. Safety assessment of coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil as a food ingredient. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 1, p. 22-34, 2009.

CABRAS, M.; GAMBINO, A.; BROCCOLETTI, R.; LODI, G. et al. Treatment of angular cheilitis: A narrative review and authors' clinical experience. **Oral diseases**, v. 26, n. 6, p. 1107-1115, 2020.

CAMPOS, A. C. V.; GONÇALVES, L. H. T. Perfil demográfico do envelhecimento nos municípios do estado do Pará, Brasil. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 71, p. 591-598, 2018.

CAREY, B.; LAMBOURNE, J.; PORTER, S.; HODGSON, T. Chronic mucocutaneous

candidiasis due to gain-of-function mutation in STAT 1. **Oral Diseases**, v. 25, n. 3, p. 684-692, 2019.

CAROLUS, H.; VAN DYCK, K.; VAN DIJCK, P. *Candida albicans* and *Staphylococcus species*: a threatening twosome. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 2162, 2019.

CHANDRAKAR, R.; RAJA, W. Effect of *coriander sativum* extract on micronucleus formation in bone marrow cells of swiss albino mice. **European Journal of Biomedical**, v. 5, n. 4, p. 465-468, 2018.

CHEN, R.; YANG, S.; ZHANG, L.; ZHOU, Y. J. Advanced strategies for production of natural products in yeast. **Iscience**, v. 23, n. 3, p. 100879, 2020.

CRUZ, G. S.; DE BRITO, E. H. S.; FREITAS, L. V.; MONTEIRO, F. P. M. Candidíase vulvovaginal na Atenção Primária à Saúde: diagnóstico e tratamento. **Revista Enfermagem Atual In Derme**, v. 94, n. 32, 2020.

DA ROCHA, W. R. V.; NUNES, L. E.; NEVES, M. L. R.; DE AZEVEDO XIMENES, E. et al. Gênero *Candida*-Fatores de virulência, Epidemiologia, Candidíase e Mecanismos de resistência. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, p. e43910414283-e43910414283, 2021.

DA SILVA RAMOS, B. M.; PERRELLA, A.; SHINOHARA, E. H.; SHITSUKA, C. et al. Median Rhomboid Glossitis in a Patient Undergoing Orthodontic Treatment. **SVOA Dentistry**, v. 2, n. 6, p. 304-307, 2021.

DA SILVA, B. P. Ensaios *in vitro* de ação inibitória das culturas de bactérias lácticas sobre linhagens de *Candida* ssp. causadoras da candidíase. **Anais dos Seminários de Iniciação Científica da UEFS**, n. 24, 2020.

DA SILVA, C. D. G.; SANCHES, C. G. S.; CHASSOT, F. *Candida parapsilosis*: resistência aos antifúngicos. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 17, p. 1-16, 2022.

DE FIGUEIREDO, K. A.; DA SILVA, H. D. P.; MIRANDA, S. L. F.; GONÇALVES, F. J. et al. Brazilian Red propolis is as effective as amoxicillin in controlling red-complex of multispecies subgingival mature biofilm *in vitro*. **Antibiotics**, v. 9, n. 8, p. 432, 2020.

DE OLIVEIRA, M. A. P.; PARENTE, R. C. M. Entendendo ensaios clínicos randomizados. **Brazilian Journal of Videoendoscopic Surgery**, v. 3, n. 4, p. 176-180, 2010.

DE ROSSI, T.; LOZOVYOY, M. A. B.; DA SILVA, R. V.; FERNANDES, E. V. et al. Interações entre *Candida albicans* e Hospedeiro. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 32, n. 1, p. 15-28, 2011.

DE SOUZA, A.; RODRIGUES, A. R. P.; RIBEIRO, M. N.; DE CARVALHO ANTUNES,

V. A study on the consumption of coriander (*Coriandrum sativum* L.) and consumers' perception of its functional properties. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 14, p. e911111436010-e911111436010, 2022.

DELGADO AZAÑERO, W. ; ARRASCUE DULANTO, M. ; LÉVANO LOAYZA, S. Candidiasis hiperplásica crónica de la lengua: Una lesión con cambios displásicos. **Revista Estomatológica Herediana**, v. 31, n. 4, p. 303-310, 2021.

DEMARTELAERE, A. C. F.; DOS SANTOS FEITOSA, S.; PRESTON, H. A. F.; PRESTON, W. et al. Influência das adubações orgânicas nas características fisiológicas do *Coriandrum sativum* L. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 11, p. 90302-90312, 2020.

DHIFI, W.; BELLILI, S.; JAZI, S.; BAHLOUL, N. et al. Essential oils chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review. **Medicines**, v. 3, n. 4, p. 25, 2016.

DOS SANTOS, E. J. R.; DA SILVA ASSIS, L.; LIMA, M. P. D.; MURATORI, M. C. S. et al. Uso de animais na experimentação animal: Revisão. **PUBVET**, v. 15, p. 169, 2021.

DOS SANTOS, J. C.; LIMA, P. H. S.; PEREIRA, M. S.; DE MELO, A. R. F. et al. Perfil das lesões orais por *Candida* spp. em pacientes com HIV. In: **Congresso Brasileiro de Ciências e Saberes Multidisciplinares**. 2022. p. 1-8.

EL FAWAL, G. F.; ABU-SERIE, M. M.; HASSAN, M. A. et al. Hydroxyethyl cellulose hydrogel for wound dressing: Fabrication, characterization and in vitro evaluation. **International journal of biological macromolecules**, v. 111, p. 649-659, 2018.

ELMAS, L.; SECME, M.; MAMMADOV, R.; FAHRIOGLU, U. et al. The determination of the potential anticancer effects of *Coriandrum sativum* in PC-3 and LNCaP prostate cancer cell lines. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 3, p. 3506-3513, 2019.

FAVORETTO, S. M.; SEABRA, D. I.; OLIVATO, M. C. M. Guia de Eutanásia Para Animais de Ensino e Pesquisa. **UNIFESP: São Paulo, Brazil**, p. 29-30, 2019.

FERREIRA, E. D. S.; ROSALEN, P. L.; BENSO, B.; DE CASSIA ORLANDI SARDI, J. et al. The use of essential oils and their isolated compounds for the treatment of oral candidiasis: a literature review. **Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine**, v. 2021, 2021.

FOUDAH, A. I.; ALQARNI, M. H.; ALAM, A.; SALKINI, M. A. et al. Evaluation of the composition and in vitro antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of Cilantro (*Coriandrum sativum* L. leaves) cultivated in Saudi Arabia (Al-Kharj). **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 6, p. 3461-3468, 2021.

FRANÇA, D. D. B. Sistemas baseados em magadeíta/diaminas alifáticas e magadeítas/ranitidina e suas aplicações. Dissertação de mestrado. 2017.

FREIRES, I. A.; DENNY, C.; BENSO, B.; ALENCAR, S. M. D. et al. Antibacterial activity of essential oils and their isolated constituents against cariogenic bacteria: a systematic review. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 7329-7358, 2015.

FREIRES, I. D. A.; MURATA, R. M.; FURLETTI, V. F.; SARTORATTO, A. *Coriandrum sativum* L.(coriander) essential oil: antifungal activity and mode of action on *Candida* spp., and molecular targets affected in human whole-genome expression. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e99086, 2014.

FREITAS, F. A. P. S.; UCHÔA, I. S.; MAGALHÃES, M. D. A. V. Importância do Teste de Micronúcleos como Instrumento Preventivo em Saúde Geral e Ambiental. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 9, p. 68530-68542, 2020.

FRIEDMAN, L.M.; FURBERG, C.D.; DEMETS, D.L. Fundamentals of Clinical Trials. 4th ed, New York, Springer; 2015. 464p.

FURLETTI, V. F.; TEIXEIRA, I. P.; OBANDO-PEREDA, G.; MARDEGAN, R. C. et al. Action of *Coriandrum sativum* L. essential oil upon oral *Candida albicans* biofilm formation. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2011.

GALVÃO, L. C. D. C.; FURLETTI, V. F.; BERSAN, S. M. F.; DA CUNHA, M. G. et al. Antimicrobial activity of essential oils against *Streptococcus mutans* and their antiproliferative effects. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

GALVÃO, L. C. D. C.; FURLETTI, V. F.; BERSAN, S. M. F.; DA CUNHA, M. G. et al. Antimicrobial activity of essential oils against *Streptococcus mutans* and their antiproliferative effects. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

GANDOVA, V.; TASHEVA, S.; MARINOVA, K.; DIMOV, M. et al. Investigation of chemical composition, thermodynamic and thermal properties of coriander (*Coriandrum sativum* L) essential oil. **Oxid. Commun**, v. 43, p. 85, 2020.

GAVIRIA, M. G.; CARNERO, L. C. G. Análisis de las rutas desíntesis de pared celular en los miembros del clado patogénico del género *Sporothrix*. 2021.

GHASEMIYEH, P.; MOHAMMADI-SAMANI, S. Hydrogels as drug delivery systems; pros and cons. **Trends in pharmaceutical sciences**, v. 5, n. 1, p. 7-24, 2019.

GRISOLIA, C. K. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. **Mutation Research/Genetic**

**Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 518, n. 2, p. 145-150, 2002.

GUIA PARA A CONDUÇÃO DE ESTUDOS NÃO CLÍNICOS DE TOXICOLOGIA E SEGURANÇA FARMACOLÓGICA NECESSÁRIOS AO DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS. ANVISA, 2013.

GUIMARÃES, M. V.; FREIRE, J. E. C.; MENEZES, L. M. B. Utilização de animais em pesquisas: breve revisão da legislação no Brasil. **Revista bioética**, v. 24, p. 217-224, 2016.

GURNING, K.; SIMANJUNTAK, H. A.; PURBA, H. Identification of the chemical compound of essential oil from ketumbar (*Coriandrum sativum* L.) leaves with GC-MS. **Pharmacognosy Journal**, v. 12, n. 5, 2020.

GURSOY, U. K.; PÖLLÄNEN, M.; KÖNÖNEN, E.; UITTO, V. J. Biofilm formation enhances the oxygen tolerance and invasiveness of *Fusobacterium nucleatum* in an oral mucosa culture model. **Journal of periodontology**, v. 81, n. 7, p. 1084-1091, 2010.

HERNAWATI, S. Management of Pseudomembranous Candidiasis on The Tongue of A Smoker Patient. **Health Notions**, v. 2, n. 12, p. 1234-1237, 2018.

JAIN, K.; VERMA, A. K.; MISHRA, P. R.; JAIN, N. K. et al. Surface-engineered dendrimeric nanoconjugates for macrophage-targeted delivery of amphotericin B: formulation development and in vitro and in vivo evaluation. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 5, p. 2479-2487, 2015.

KAČÁNIOVÁ, M.; GALOVIČOVÁ, L.; IVANIŠOVÁ, E.; VUKOVIC, N. L. et al. Antioxidant, antimicrobial and antibiofilm activity of coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil for its application in foods. **Foods**, v. 9, n. 3, p. 282, 2020.

KHAKSHOUR, A.; KARIMZADEH, G.; SABET, M. S.; SAYADI, V. Study of Morpho-phenological diversity and expression of genes involved in  $\gamma$ -Terpinene and Linalool biosynthesis in Iranian endemic populations of coriander (*Coriandrum sativum* L.). **Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research**, v. 29, n. 1, p. 51-63, 2021.

KOLENBRANDER, P. E.; PALMER JR, R. J.; PERIASAMY, S.; JAKUBOVICS, N. S. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell–cell distance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 471-480, 2010.

LEE, Y.; PUUMALA, E.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Antifungal drug resistance: molecular mechanisms in *Candida albicans* and beyond. **Chemical reviews**, v. 121, n. 6, p. 3390-3411, 2020.

LIMA, I. O.; PEREIRA, F. O.; OLIVEIRA, W. A.; LIMA, E. O. et al. Antifungal activity

and mode of action of carvacrol against *Candida albicans* strains. **The Journal of Essential Oil Research**, v. 25, n. 2, p. 138-142, 2013

LOMBARDI, A.; OUANOUNOU, A. Fungal infections in dentistry: Clinical presentations, diagnosis, and treatment alternatives. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 130, n. 5, p. 533-546, 2020.

LÓPEZ-GARCÍA, J.; LEHOCKÝ, M.; HUMPOLÍČEK, P.; SÁHA, P. HaCaT keratinocytes response on antimicrobial atelocollagen substrates: extent of cytotoxicity, cell viability and proliferation. **Journal of functional biomaterials**, v. 5, n. 2, p. 43-57, 2014.

LORENZO-POUSO, A. I.; PÉREZ-JARDÓN, A.; CAPONIO, V. C. A.; SPIRITO, F. et al. Oral Chronic Hyperplastic Candidiasis and Its Potential Risk of Malignant Transformation: A Systematic Review and Prevalence Meta-Analysis. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 10, p. 1093, 2022.

MABROUK, M.; ISMAIL, E.; BEHEREI, H.; ABO-ELFADL, M. T. et al. Biocompatibility of hydroxyethyl cellulose/glycine/RuO<sub>2</sub> composite scaffolds for neural-like cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 209, p. 2097-2108, 2022.

MAHLEYUDDIN, N. N.; MOSHAWIH, S.; MING, L. C.; ZULKIFLY, H. H. et al. *Coriandrum sativum* L.: A review on ethnopharmacology, phytochemistry, and cardiovascular benefits. **Molecules**, v. 27, n. 1, p. 209, 2021.

MATASYOH, J. C.; MAIYO, Z. C.; NGURE, R. M.; CHEPKORIR, R. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Coriandrum sativum*. **Food Chemistry**, v. 113, n. 2, p. 526-529, 2009.

MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119-128, 2013.

MCCARTY, T. P.; WHITE, C. M.; PAPPAS, P. G. Candidemia and invasive candidiasis. **Infectious Disease Clinics**, v. 35, n. 2, p. 389-413, 2021.

MECHCHATE, H.; ES-SAFI, I.; AMAGHNOUJE, A.; BOUKHIRA, S. A. et al. Antioxidant, anti-inflammatory and antidiabetic proprieties of LC-MS/MS identified polyphenols from coriander seeds. **Molecules**, v. 26, n. 2, p. 487, 2021.

MELO, A. K. V. Estudo *in silico* e *in vitro* da atividade antifúngica do p-cumarato de 4-clorobenzila sobre *Candida* spp. Dissertação de mestrado em Odontologia. 2021.

MILLSOP, J. W.; FAZEL, N. Oral candidiasis. **Clinics in dermatology**, v. 34, n. 4, p. 487-494, 2016.

MIRANDA, S. L. F. et al. Brazilian red propolis reduces orange-complex

periodontopathogens growing in multispecies biofilms. **Biofouling**, v. 35, n. 3, p. 308-319, 2019.

MODARRESI CHAHARDEHI, A.; ARSAD, H.; LIM, V. Zebrafish as a successful animal model for screening toxicity of medicinal plants. **Plants**, v. 9, n. 10, p. 1345, 2020.

MOHARAMZADEH, K.; VAN NOORT, R.; BROOK, I. M.; SCUTT, A. M. Cytotoxicity of resin monomers on human gingival fibroblasts and HaCaT keratinocytes. **Dental materials**, v. 23, n. 1, p. 40-44, 2007.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NAGAI, T. ; MACHIDA, Y. Buccal delivery systems using hydrogels. **Advanced drug delivery reviews**, v. 11, n. 1-2, p. 179-191, 1993.

NING, F.; ZHANG, J.; KANG, M.; MA, C. et al. Hydroxyethyl cellulose hydrogel modified with tannic acid as methylene blue adsorbent. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 138, n. 8, p. 49880, 2021.

OK, S. M.; HO, D.; LYND, T.; AHN, Y. W. et al. *Candida* Infection Associated with Salivary Gland—A Narrative Review. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 1, p. 97, 2020.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 301-307, 2008.

PARDI, G.; CARDOZO, E. I. Algunas consideraciones sobre *Candida albicans* como agente etiológico de candidiasis bucal. **Acta odontol. venez**, p. 9-17, 2002.

PARK, G.; KIM, H. G.; KIM, Y. O.; PARK, S. H. et al. *Coriandrum sativum* L. protects human keratinocytes from oxidative stress by regulating oxidative defense systems. **Skin pharmacology and physiology**, v. 25, n. 2, p. 93-99, 2012.

PATHAN, A. R.; KOTHAWADE, K. A.; LOGADE, M. N. Anxiolytic and analgesic effect of seeds of *Coriandrum sativum* Linn. **Int J Res Pharm Chem**, v. 1, n. 4, p. 1087-1099, 2011.

PEDROSO, R. D. S.; ANDRADE, G.; PIRES, R. H. Plantas medicinais: uma abordagem sobre o uso seguro e racional. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 31, 2021.

PEDROSO, R. D. S.; BALBINO, B. L.; ANDRADE, G.; DIAS, M. C. P. S. et al. *In vitro* and *in vivo* anti-*Candida* spp. activity of plant-derived products. **Plants**, v. 8, n. 11, p. 494, 2019.

PESSINA, A.; RAIMONDI, A.; CERRI, A.; PICCIRILLO, M. et al. High sensitivity of human epidermal keratinocytes (HaCaT) to topoisomerase inhibitors. **Cell Proliferation**, v. 34, n. 4, p. 243-252, 2001.

PLAS, R. V. D. Candidíase oral: Manifestações clínicas e Tratamento. 2016. Tese de Doutorado.

PRASATH, K. G.; THARANI, H.; KUMAR, M. S.; PANDIAN, S. K. Palmitic acid inhibits the virulence factors of *Candida tropicalis*: Biofilms, cell surface hydrophobicity, ergosterol biosynthesis, and enzymatic activity. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 864, 2020.

PRISTOV, K. E.; GHANNOUM, M. A. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 7, p. 792-798, 2019.

RAJESHWARI, C. U.; SHOBHA, R. I.; ANDALLU, B. Antihemolytic activity of various fractions of methanolic extract of coriander (*Coriandrum sativum* L.) leaves and seeds: A comparative study. **Pakistan Journal of Food Sciences**, v. 22, n. 1, p. 1-6, 2012.

RASHEED, D. M.; SERAG, A.; SHAKOUR, Z. T. A.; FARAG, M. Novel trends and applications of multidimensional chromatography in the analysis of food, cosmetics and medicine bearing essential oils. **Talanta**, v. 223, p. 121710, 2021.

REIS, M. J. P.; MEIRELES, M. E.; DO NASCIMENTO, T. G.; ALVINO, V. et al. Estudo das plantas da renome no âmbito da toxicologia clínica: uma revisão sistemática da literatura. **Humanidades & Inovação**, v. 8, n. 50, p. 170-185, 2021.

RESOLUÇÃO NORMATIVA 38/2018. CONCEA, Brasília, Brasil, 2018. Disponível em<[http://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes\\_normativas/RN-38.pdf](http://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/RN-38.pdf)> . Acesso em: 26 mai. 2022.

RODLOFF, A.; KOCH, D.; SCHAUMANN R. Epidemiology and antifungal resistance in invasive candidiasis. **European J Med Res**. v. 16, n. 4, p. 187-195, 2011.

RODRÍGUEZ ORTEGA, J.; MIRANDA TARRAGÓ, J.; MOREJÓN LUGONES, H.; SANTANA GARAY, J. C. Candidiasis de la mucosa bucal: Revisión bibliográfica. **Revista Cubana de Estomatología**, v. 39, n. 2, p. 187-233, 2002.

SALERNO, C.; PASCALE, M.; CONTALDO, M.; ESPOSITO, V. et al. *Candida*-associated denture stomatitis. **Oral medicine and pathology**, v. 16, n. 2, p. 39-43, 2011

SALOMÉ VEIGA, A.; SCHNEIDER, J. P. Antimicrobial hydrogels for the treatment of infection. **Peptide Science**, v. 100, n. 6, p. 637-644, 2013.

SCHNAIDER, T. B.; SOUZA, C. Aspectos éticos da experimentação animal. **Revista**

**Brasileira de Anestesiologia**, v. 53, n. 2, p. 278-285, 2003.

SERRA, E.; SAUBADE, F.; LIGORIO, C.; WHITEHEAD, K. et al. Methylcellulose hydrogel with *Melissa officinalis* essential oil as a potential treatment for oral candidiasis. **Microorganisms**, v. 8, n. 2, p. 215, 2020.

SHAHWAR, M. K.; EL-GHORAB, A. H.; ANJUM, F. M.; BUTT, M. S. et al. Characterization of coriander (*Coriandrum sativum* L.) seeds and leaves: volatile and non volatile extracts. **International journal of food properties**, v. 15, n. 4, p. 736-747, 2012.

SHARMA, A. Oral candidiasis: An opportunistic infection: A review. **Int J Appl Dent Sci**, v. 5, n. 1, p. 23-7, 2019.

SHARMA, D.; SABELA, M. I.; KANCHI, S. et al. Green synthesis, characterization and electrochemical sensing of silymarin by ZnO nanoparticles: Experimental and DFT studies. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 808, p. 160-172, 2018.

SHARMA, N.; SRIVASTAV, A. K.; SAMUEL, A. J. Ensaio clínico randomizado: padrão ouro de desenhos experimentais-importância, vantagens, desvantagens e preconceitos. **Rev Pesqui Fisioter**, v. 10, n. 3, p. 512-9, 2020.

SHAROPOV, F. S.; VALIEV, A.; SATYAL, P.; SETZER, W. N. et al. Chemical composition and anti-proliferative activity of the essential oil of *Coriandrum sativum* L. **Am. J. Essent. Oils Nat. Prod**, v. 5, p. 11-15, 2017.

SHRIRAME, B. S.; GEED, S. R.; RAJ, A.; PRASAD, S. et al. Optimization of supercritical extraction of coriander (*Coriandrum sativum* L.) seed and characterization of essential ingredients. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 21, n. 2, p. 330-344, 2018.

SILVA, A. D. M.; SILVA, G. G. D.; FRANÇA, G. M. D.; MORAIS, E. F. D. et al. Estomatite protética associada a candidíase pseudomembranosa em paciente geriátrico: relato de caso. **Rev. Odontol. Araçatuba (Impr.)**, p. 30-33, 2020.

SILVA, K. G. V., PIRES, K. G. R., FURTADO, H. L. A., MOTTA, B. L. A. et al. Morfologia, epidemiologia e virulência de espécies do gênero *Candida*. **Tópicos nas ciências da saúde**, v. 7, p. 42 - 58. 2021

SILVA, M. A. D.; COELHO JÚNIOR, L. F.; SANTOS, A. P. Vigor de sementes de coentro (*Coriandrum sativum* L.) provenientes de sistemas orgânico e convencional. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 14, p. 192-196, 2012.

SIMÕES, R. J.; FONSECA, P.; FIGUEIRAL, M. H.. Infecções por *Candida* spp na cavidade oral. **Odontologia Clínico-Científica (Online)**, v. 12, n. 1, p. 19-22, 2013.

SINGLA, R. K.; DUBEY, A. K. Molecules and metabolites from natural products as

inhibitors of biofilm in *Candida* spp. pathogens. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 28, p. 2567, 2019.

SOARES, B. V.; MORAIS, S. M.; DOS SANTOS FONTENELLE, R. O.; QUEIROZ, V. A. et al. Antifungal activity, toxicity and chemical composition of the essential oil of *Coriandrum sativum* L. fruits. **Molecules**, v. 17, n. 7, p. 8439-8448, 2012.

SOARES, G.; MS et al. Effects of azithromycin, metronidazole, amoxicillin, and metronidazole plus amoxicillin on an in vitro polymicrobial subgingival biofilm model. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 5, p. 2791-2798, 2015.

SOLMAZ, G.; KORACHI, M. Inhibition and disruption properties of chlorhexidine gluconate on single and multispecies oral biofilms. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 61-66, 2013.

SOUSA, J. P.; QUEIROZ, E. O.; GUERRA, F. Q.; MENDES, J. M. et al. Morphological alterations and time-kill studies of the essential oil from the leaves of *Coriandrum sativum* L. on *Candida albicans*. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 15, n. 6, p. 398-406, 2016.

TALAPKO, J.; JUZBAŠIĆ, M.; MATIJEVIĆ, T.; PUSTIJANAC, E. et al. *Candida albicans*—the virulence factors and clinical manifestations of infection. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 2, p. 79, 2021.

TEODORO, P. D. S.; FERNANDES, H. V. D. S.; SÁ, E. C.; PIMENTEL, L. A. C. O uso da terapia fotodinâmica como método alternativo de tratamento da candidíase oral. **Revista Arquivos Científicos (IMMES)**, v. 3, n. 1, p. 14-23, 2020.

TEPAL, K. F.; BONIFAZ, A. Aspectos inmunológicos de la candidosis mucocutánea crónica. **Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica**, v. 18, n. 4, p. 296-306, 2021.

THOMPSON, D. S.; CARLISLE, P. L.; KADOSH, D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. **Eukaryotic cell**, v. 10, n. 9, p. 1173-1182, 2011.

TRINDADE, L. A.; DE ARAÚJO OLIVEIRA, J.; DE CASTRO, R. D.; DE OLIVEIRA LIMA, E. Inhibition of adherence of *C. albicans* to dental implants and cover screws by *Cymbopogon nardus* essential oil and citronella. **Clinical oral investigations**, v. 19, n. 9, p. 2223-2231, 2015.

VIEIRA, A. J. H.; SANTOS, J. I. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. **RBAC**, v. 49, n. 3, p. 60 235-9, 2017.

WANG, H.; LIU, Y.; CAI, K.; ZHANG, B. et al. Antibacterial polysaccharide-based hydrogel dressing containing plant essential oil for burn wound healing. **Burns &**

trauma, v. 9, 2021.

WORKMAN, P. et al. - Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *British Journal of Cancer*. 102:11 (2010) 1555–1577.

WRIGHT, G. D. Unlocking the potential of natural products in drug discovery. **Microbial biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 55-57, 2019.

WRÓBLEWSKA, M.; SZYMAŃSKA, E.; SZEKALSKA, M.; WINNICKA, K. Different types of gel carriers as metronidazole delivery systems to the oral mucosa. **Polymers**, v. 12, n. 3, p. 680, 2020.

XIAO, J. L.; XU, G. C.; DE HOOG, S.; QIAO, J. J. et al. Oral prevalence of *Candida* species in patients undergoing systemic glucocorticoid therapy and the antifungal sensitivity of the isolates. **Infection and Drug Resistance**, p. 2601-2607, 2020.

YADAV, C. K.; TIWARI, P.; MEHTA, R.; SHRIVASTAVA, A. K. et al. Analgesic Effect of Ethanolic Extract of Seeds and Leaves of *Coriandrum Sativum* on Swiss Albino Mice. **Journal of Universal College of Medical Sciences**, v. 9, n. 02, p. 50-55, 2021.

YASHNI, G.; AL-GHEETHI, A.; MOHAMED, R. M. S. R. et al. Characterization of *Coriandrum sativum* leaves as a sustainable green biosorbent. **Materials Today: Proceedings**, v. 47, p. 1345-1349, 2021.

YOO, Y. J.; KIM, A. R.; PERINPANAYAGAM, H.; HAN, S. H.; KUM, K. Y. *Candida albicans* virulence factors and pathogenicity for endodontic infections. **Microorganisms**, v. 8, n. 9, p. 1300, 2020.

ZANUSSO-JUNIOR, G. et al. Avaliação da atividade antiinflamatória do coentro (*Coriandrum sativum* L.) em roedores. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, v. 13, p. 17-23, 2011.

ZHENG, W.; HAO, Y.; WANG, D.; HUANG, H. et al. Preparation of triamcinolone acetonide-loaded chitosan/fucoidan hydrogel and its potential application as an oral mucosa patch. **Carbohydrate Polymers**, v. 272, p. 118493, 2021.

*Alexis*

ANEXO I – Parecer consubstanciado da Comissão de Ética em Pesquisa com seres humanos do Centro de Ciências da Saúde (CEP/CCS/UFPB).

CENTRO DE CIÊNCIAS DA  
SAÚDE DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DA PARAÍBA -  
CCS/UFPB



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Produção de hidrogel contendo óleo essencial de *Coriandrum sativum* L. (coentro) com efeito sobre *Candida* spp. envolvidas com infecções da cavidade bucal

**Pesquisador:** DAVID HENRIQUE XAVIER BARBOSA

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 58165222.6.0000.5188

**Instituição Proponente:** Centro De Ciências da Saúde

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 5.808.797

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

JOAO PESSOA, 12 de Dezembro de 2022

---

**Assinado por:**

**Eliane Marques Duarte de Sousa  
(Coordenador(a))**

## ANEXO II – Certidão de aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais.



Universidade  
Federal da  
Paraíba

Comissão de Ética no  
Uso de Animais

Biotério



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Produção de hidrogel contendo óleo essencial de *Coriandrum sativum* L. (coentro) com efeito sobre *Candida* spp. envolvidas com infecções da cavidade bucal", protocolada sob o CEUA nº 7842290422 (ID 001681), sob a responsabilidade de **Ricardo Dias de Castro e equipe; David Henrique Xavier Barbosa** - 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 08/06/2022.

We certify that the proposal "Production of hydrogel containing essential oil of *Coriandrum sativum* L. (coriander) with effect on *Candida* spp. involved with infections of the oral cavity", utilizing 48 Heterogenics mice (48 males), 48 Heterogenics rats (48 males), protocol number CEUA 7842290422 (ID 001681), under the responsibility of **Ricardo Dias de Castro and team; David Henrique Xavier Barbosa** - 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 06/08/2022.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [07/2022](#) a [12/2022](#) Área: [Ciências Farmacêuticas](#)

Origem: [Centro de Bioterismo da Universidade Estadual da Paraíba](#)

Espécie: [Camundongos heterogênicos](#) sexo: [Machos](#) idade: [5 a 6 semanas](#) N: [48](#)

Linhagem: [Mus musculus - Swiss](#) Peso: [28 a 30 g](#)

Origem: [Centro de Bioterismo da Universidade Estadual da Paraíba](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#) sexo: [Machos](#) idade: [90 a 100 dias](#) N: [48](#)

Linhagem: [Rattus Norvegicus - Wistar](#) Peso: [290 a 300 g](#)

Local do experimento: Os experimentos com ratos e camundongos serão realizados no laboratório de Psicofarmacologia (IpeFarm/UFPB). Os experimentos com os embriões e larvas de Danio rerio serão realizados na Unidade de Produção de Organismos Não Convencionais (UniPon)/UFPB.

João Pessoa, 08 de junho de 2022

Profa. Dra. Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Ivya Carmem Talleri  
Vice-Cordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal da Paraíba