

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

**ATIVIDADE BIOLÓGICA DO ISOEUGENOL E  
ACETAMIDAS HIBRÍDOS FRENTE A LEVEDURAS  
DO GÊNERO *Candida***

**Daianne de Sousa Medeiros**

**SAPIENTIA AEDIFICAT**

2018

**DAIANNE DE SOUSA MEDEIROS**

**ATIVIDADE BIOLÓGICA DO ISOEUGENOL E ACETAMINAS  
HÍBRIDOS FRENTE A LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração em Ciências Odontológicas.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Edeltrudes de Oliveira Lima

João Pessoa

2018

## Catlogação na publicação Seção de Catalogação e

M488a Medeiros, Daianne de Sousa.

Atividade biológica do isoeugenol e acetaminas híbridos frente a leveduras do gênero Candida / Daiannede Sousa Medeiros. - João Pessoa, 2018.

84 f. : il.

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

1. Odontologia - Isoeugenol. 2. Produtos naturais.  
3. Atividade antifúngica. 4. Candida spp. I. Lima, Edeltrudes de Oliveira. II. Título.

UFPB/B

CDU 616.314:547.566.2(043)

Classificação



ATA DA DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
DEFESA DE Nº: 233

Aos dez dias do mês de dezembro do ano de 2018, às 14:00 horas, no Auditório do CCS/UFPB, reuniram-se os membros da banca examinadora composta pelos professores doutores: Edeltrudes de Oliveira Lima (Orientadora e Presidente), André Ulisses Dantas Batista (membro vinculado ao Programa de Pós-graduação em Odontologia – UFPB) e Hilizeth de Luna Pessoa (membro externo) a fim de argüirem a mestranda Daianne de Sousa Medeiros, com relação ao seu trabalho final de curso de mestrado (dissertação), sob o título "Atividade biológica do isoeugenol e acetaminas híbridos frente a leveduras do gênero *Candida*". Aberta a sessão pelo presidente da mesma, coube a candidata, na forma regimental, expor o tema de sua dissertação, dentro do tempo regulamentar. Em seguida, foi questionado pelos membros da banca examinadora, sendo as explicações necessárias fornecidas e as modificações solicitadas registradas. Logo após, os membros da banca examinadora reuniram-se em sessão secreta, tendo chegado ao seguinte julgamento, que, de público, foi anunciado: 1º Examinador (membro externo): Conceito "Aprovado"; 2º Examinador (membro vinculado ao PPGO): Conceito "Aprovado"; e 3º Examinador (Orientador e Presidente): Conceito "Aprovado". O que resultou em conceito final igual: "APROVADO", o que permite a candidata fazer jus ao título de Mestre em Odontologia. Os documentos utilizados para avaliação da candidata durante o processo aqui descrito apresentam-se como prova documental do mesmo e, como tal, serão anexadas a esta ata para arquivamento. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata, que será por mim assinada, Raissa Karen Gomes dos Santos Barboza, do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFPB, pela presidente, pelos demais membros da banca, e pela candidata.

Raissa K. Santos Barboza  
Secretária

H. Luna Pessoa  
1º Examinador – Membro Externo

A. Ulisses Dantas Batista  
2º Examinador – Membro do PPGO

E. de Oliveira Lima  
3º Examinador – Presidente

Daianne de Sousa Medeiros  
Candidata

***À minha mãe,  
mulher guerreira,  
batalhadora,  
principal motivo  
das minhas realizações profissionais.  
Dedico.***

## AGRADECIMENTOS

A Deus por sua divina bondade e graça em minha vida;

Aos meus pais, Maria Alice de Sousa e Antônio Francisco Medeiros (*in memoriam*), por me ensinar a escolher os caminhos bons e por todo amor, carinho, dedicação e paciência a mim destinados;

Ao meu irmão Davi de Sousa Medeiros, por ser tão amoroso com a “maninha chata” nos momentos de estresse. Aos meus familiares pelo incentivo ao crescimento na vida profissional. Aos meus amigos, seres de fundamental importância em minha vida;

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima, por todo ensinamento, apoio, dedicação, orientação e confiança no meu trabalho;

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO), por todo ensinamento compartilhado;

Aos professores Dr. Ricardo Castro e Dra. Claudia Helena pela oportunidade, confiança e ensinamentos didáticos durante o período de estágio em docência;

Ao professor Dr. Wilton Padilha, pelo acolhimento no projeto de extensão EPISaúde, pelas conversas, conselhos e por acreditar em mim quando nem eu mesma acreditava que seria capaz;

À Prof<sup>a</sup> Dra. Luciana Scotti pelos ensinamentos e contribuição neste estudo;

Aos colegas de turma do PPGO pela acolhida, conversas, risadas e momentos de angústia compartilhados. (Amei conhecer cada um de vocês!);

Aos colegas de equipe do Laboratório de Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, em especial Daniele Figueiredo, Jefferson Rodrigues e Klidenberg Junior pelo companheirismo e ajuda no desenvolvimento deste trabalho;

Aos colegas do EPISaúde pela vivência pela experiência compartilhada. Em especial as amigas Lara Honório e Marília Paixão pelas conversas, risadas, festas,

angústias e conselhos partilhados. (Vocês foram fundamentais na minha vida durante essa fase e orarei pela permanência da nossa amizade mesmo após mestrado);

À Jessica Viana pela disponibilidade e materiais compartilhados sempre que tive dúvidas na execução do *docking*;

Aos professores da Escola Técnica de Saúde, em especial Dr. Lúcio Castellano, Dr. Ronaldo Sarmiento, Dra. Ana Carolina Dulgerrof por ter me incentivado a fazer a seleção do programa e a Dra. Gildeci Alves de Lira por me ajudar em um dos momentos mais difíceis da minha vida;

Às profissionais de saúde mental, Dra. Celeste Moura Lins Silva e Alice Christine Souza Silva por todo acompanhamento e por acalmar meu coração e meus pensamentos ansiosos. (Sem vocês eu não teria conseguido concluir este trabalho);

A minha grande amiga Prof<sup>a</sup>. Dra. Priscilla Anne, por sua amizade e colo quando mais precisei;

A Francisco das Chagas Oliveira, pela força e o carinho que tem me dado;

A Bruno Oliveira de Veras por ter me incentivado a fazer a seleção;

À Universidade Federal da Paraíba, em especial ao Centro de Ciências da Saúde e ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia pelo suporte técnico, estrutural e pela oportunidade de realização deste curso;

Ao CNPq pelo incentivo financeiro;

A todos que mesmo não sendo citados, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho...

**Muito obrigada!**

*“É preciso que eu suporte duas ou três larvas  
se quiser conhecer as borboletas.”*

(Antoine de Saint-Exupéry)

## RESUMO

A cavidade bucal é um ambiente naturalmente habitado por diversas espécies que micro-organismos que coexistem sem causar nenhum dano aos seres humanos. Entre as espécies fúngicas, o gênero *Candida* é o mais frequentemente isolado na cavidade bucal de indivíduos saudáveis, entretanto, quando há mudanças de fatores locais ou sistêmicos no hospedeiro, essas leveduras passam do estado comensal para o patogênico, desencadeando o processo infeccioso denominado candidíase. O presente estudo objetivou avaliar a sensibilidade *in vitro* de cepas *C. albicans* e não-*albicans* (*C. tropicalis* e *C. glabrata*) frente ao isoeugenol e nistatina, através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM); Concentração Fungicida Mínima (CFM); interferência sobre a micromorfologia microbiana e teste de modulação dos produtos- *checkerboard*. Utilizou-se neste estudo 19 cepas de *Candida*, sendo 7 cepas clínicas de *C. tropicalis* e uma padrão ATCC 13803; quatro clínicas de *C. glabrata* e sua ATCC 90030 e cinco clínicas e uma padrão (ATCC 76485) de *C. albicans*. Pode-se observar atividade antifúngica do isoeugenol em todos os isolados testado com CIM<sub>70%</sub> de 128 µg/mL. As moléculas acetamidas híbridas não demonstraram nenhuma atividade antifúngica contra as cepas avaliadas, com valor da CIM<sub>100%</sub> de 1024 µg/mL. A relação CFM/CIM do isoeugenol indicou atividade fungicida em 84,21% das cepas testadas. O isoeugenol foi capaz de interferir na formação de estruturas de virulência nas espécies *C. albicans* e *C. tropicalis*, nas concentrações da CIM, CIMX2 e CIMX4. O teste de modulação do isoeugenol e nistatina demonstrou interação do tipo antagonista em *C. glabrata* LM-116, sinérgica em *C. tropicalis* LM-211 e indiferente *C. albicans* LM-4b. A partir dos dados obtidos neste estudo, foi possível concluir que o isoeugenol apresenta boa atividade antifúngica frente as espécies de *Candida* avaliadas, podendo ser uma alternativa terapêutica no tratamento de candidíases bucais.

**Palavras-chave:** Atividade antifúngica, Produtos naturais, Isoeugenol, *Candida* spp.

## ABSTRACT

The oral cavity is an environment naturally inhabited by several species that microorganisms coexist without causing any harm to humans. Among fungal species, the *Candida* genus is the most frequently isolated in the oral cavity of healthy individuals, however, when there are changes of local or systemic factors in the host, these yeasts pass from the commensal state to the pathogen, triggering the infectious process called candidiasis. The present study aimed to evaluate the in vitro susceptibility of *C. albicans* and non-*albicans* strains (*C. tropicalis* and *C. glabrata*) against isoeugenol and nystatin by determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC); Minimum Fungicidal Concentration (CFM); interference on microbial micromorphology and product modulation test- checkerboard. In this study, 19 *Candida* strains were used, with 7 clinical isolates of *C. tropicalis* and one ATCC 13803 standard; four clinics of *C. glabrata* and its ATCC 90030 and five clinics and one standard (ATCC 76485) of *C. albicans*. Antifungal activity of isoeugenol can be observed in all isolates tested with MIC70% of 128 µg/mL. Hybrid acetamide molecules did not demonstrate any antifungal activity against the strains evaluated, with an MIC of 100% of 1024 µg/mL. The CFM/MIC ratio of isoeugenol indicated fungicidal activity in 84.21% of the strains tested. Isoeugenol was able to interfere in the formation of virulence structures in *C. albicans* and *C. tropicalis* species at MIC, CIMX2 and CIMX4 concentrations. The modulation test of isoeugenol and nystatin demonstrated antagonist type interaction in *C. glabrata* LM-116, synergistic in *C. tropicalis* LM-211 and indifferent *C. albicans* LM-4b. From the data obtained in this study, it was possible to conclude that isoeugenol has good antifungal activity against the *Candida* species evaluated and may be a therapeutic alternative in the treatment of oral candidiasis.

**Keywords:** Antifungal activity, Natural products, Isoeugenol, *Candida* spp.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C – Grau Celsius

cm<sup>3</sup> – Centímetro cúbico

g - Grama

µg – Micrograma

µL - Microlitro

mL – Mililitro

mol – Massa molar

pH – Potencial Hidrogeniônico

q.s.p – Quantidade Suficiente Para

ASD – Ágar Sabouraud Dextrose

ATCC – American Type Culture Collection

CCEN – Centro de Ciências Exatas e da Natureza

CCS – Centro de Ciências da Saúde

CFM – Concentração Fungicida Mínima

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CIF – Concentração Inibitória Fracionada

DCF – Departamento de Ciências Farmacêuticas

DMSO – Dimetil Sulfóxido

DQ – Departamento de Química

ICIF – Índice de Concentração Inibitória Fracionada

ISO A – Código para substâncias sintéticas derivada do Isoeugenol

OE – Óleo essencial

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UFPB – Universidade Federal da Paraíba

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura molecular da nistatina .....	6
Figura 2: Mecanismo de ação dos antifúngicos poliênicos e formação de poros transmembranares. ....	7
Figura 3: Estrutura molecular dos azóis. ....	8
Figura 4: Mecanismo de ação das drogas azólicas na síntese do ergosterol da membrana plasmática fúngica.....	9
Figura 5: Estrutura molecular do isoeugenol. ....	13
Figura 6: Estrutura molecular do eugenol. ....	13

### CAPÍTULO 1

Figura 1: Esqueleto molecular do isoeugenol .....	18
Figura 2: Esqueleto molecular do eugenol. ....	18
Figura 3: Micromorfologia de <i>C. tropicalis</i> na ausência (controle) e presença do isoeugenol e nistatina. (a) Grupo controle LM-211 demonstrando estruturas de crescimento blastoconídios e pseudo-hifas. (b) LM-211 sob influência do isoeugenol na CIM, evidenciando a presença de blastoconídios. (c) LM-211 na presença do antifúngico nistatina .....	25

### CAPITULO 2

Figura 1: Estrutura química das substâncias acetaminas derivadas do isoeugenol. A: ISO A1; B: ISO A2; C: ISO A3; D: ISO A4; E: ISO A5; F: ISO A6; G: ISO A7; H: ISO A8; I: A10; J: ISO A11; K: isoeugenol.....	37
--	----

Figura 2: Crescimento de pseudo-hifas e blastoconídios do isolado ATCC 76485 na presença do isoeugenol (CIM, CIMX2 e CIMX4) e na ausência do fitoconstituente (controle). .....	43
Figura 3: Crescimento de pseudo-hifas e blastoconídios do isolado LM-4b na presença do isoeugenol (CIM, CIMX2 e CIMX4) e na ausência do fitoconstituente (controle). .....	43
Figura 4: Micromorfologia em microscopia óptica comum (aumento 400x) na ausência e presença do isoeugenol. A) <i>C. albicans</i> ATCC 76485 na ausência do isoeugenol (controle), evidenciando estruturas de virulência pseudo-hifas e blastoconídios B) <i>C. albicans</i> ATCC 76485 na presença do isoeugenol, exibindo ausência de pseudo-hifas e número reduzido de blastoconídios. C) <i>C. albicans</i> LM-4b na ausência do isoeugenol, demonstrando grande quantidade de blastoconídios e pseudo-hifas. D) <i>C. albicans</i> LM-4b sob efeito do isoeugenol exibindo ausência de blastoconídios.....	43
Figura 5 A: Interações observadas entre isoeugenol e 14- $\alpha$ -desmetilase. Linhas tracejadas azuis indicam ligações de hidrogênio. Linhas tracejadas vermelhas indicam ligações eletrostáticas.....	45
Figura 5 B: Interações observadas entre isoeugenol e Delta-14- $\alpha$ -redutase. Linhas tracejadas azuis indicam ligações de hidrogênio.....	46
Figura 5 C: Interações observadas entre isoeugenol e Lanosterol-14- $\alpha$ -desmetilase. Linhas tracejadas azuis indicam ligações de hidrogênio .....	46
Figura 5 D – Interações observadas entre isoeugenol e $\beta$ -1,3 glucano. Linhas tracejadas azuis indicam ligações de hidrogênio.....	47
Figura 6 A – Interações entre ISO A2 e 14- $\alpha$ -desmetilase. Linhas tracejadas azuis indicam ligações de hidrogênio. Linhas tracejadas vermelhas indicam ligações eletrostáticas. ....	48
Figura 6 B – Interações entre ISO A2 e Delta-14- $\alpha$ -redutase. Linhas tracejadas azuis indicam ligações de hidrogênio. Linhas tracejadas vermelhas indicam ligações eletrostáticas. ....	48

Figura 6 C – Interações entre ISO A2 e Lanosterol-14- $\alpha$ -desmetilase. Linhas tracejadas azuis indicam ligações de hidrogênio. Linhas tracejadas vermelhas indicam ligações eletrostáticas.....49

Figura 6D – Interações entre ISO A2 e  $\beta$ -1,3 D-glucano. Linhas tracejadas azuis indicam ligações de hidrogênio. Linhas tracejadas vermelhas indicam ligações eletrostáticas. .... 49

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

Tabela 1: Resultados da relação CIM, CFM e CFM/CIM do isoeugenol, nistatina e controle de esterilidade e viabilidade das cepas frente *C. tropicalis* e *C. glabrata*. A CIM e CFM apresentam valores expressos em µg/mL .....22

Tabela 2: Interação do antifúngico nistatina com isoeugenol sobre *C. glabrata* ATCC 90030, *C. glabrata* LM-116, *C. tropicalis* ATCC 13803 e *C. tropicalis* LM-211 23

### CAPÍTULO 2

Tabela 1: Resultados da atividade antifúngica do isoeugenol com nistatina sobre *C. albicans*.....41

Tabela 2: Teste de modulação entre isoeugenol e nistatina sobre *C. albicans* ATCC 76485 e LM-4B ..... 44

Tabela 3: Energias de ligação isoeugenol e molécula híbrida ISO A2 com enzimas fúngicas selecionadas. .... 45

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. CAPÍTULO 1: Atividade Antifúngica do Isoeugenol e Estudo de Interação com Nistatina Sobre Células de <i>Candida tropicalis</i> e <i>Candida glabrata</i> Isoladas da Cavidade Oral: Um Estudo <i>In Vitro</i> .....</b>	<b>14</b>
2.1 Introdução.....	16
2.2 Materiais e Métodos.....	17
2.2.1 Substância padrão, fitoconstituente .....	17
2.2.2 Meio de cultura. ....	17
2.2.3 Cepas fúngicas e preparação dos inóculos .....	18
2.2.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) .....	18
2.2.5 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) .....	19
2.2.6 Ação dos Compostos sobre a micromorfologia de <i>C. tropicalis</i> .....	19
2.2.7 Estudo de Associação <i>in vitro</i> .....	20
2.3 Resultados e Discussão .....	21
2.4 Conclusão .....	26
Agradecimentos	
Referências	
<b>3. CAPÍTULO 2: Atividade antifúngica <i>in vitro</i> e <i>in silico</i> do fitoconstituente isoeugenol e acetamidas híbridos sobre <i>Candida albicans</i> isolado da cavidade bucal.....</b>	<b>33</b>
3.1 Introdução.....	34
3.2 Materiais e Métodos. ....	36
3.2.1 Local da pesquisa.....	36
3.2.2 Produtos testes.....	37
3.2.3 Mlicro-organismos. ....	38
3.2.4 Triagem microbiológica e Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	38
3.2.5 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM).....	39
3.2.6 Ação dos produtos testes sobre a micromorfologia de <i>C. albicans</i> .....	39
3.2.7 Estudo de Associação <i>in vitro</i> .....	40
3.2.8 <i>Docking</i> Molecular .....	40
3.2.9 Análises dos dados.....	41

3.3 Resultados.....	41
3.3.1 Determinação da CIM e CFM .....	41
3.3.2 Interferência do isoeugenol sobre a micromorfologia de <i>C. albicans</i> .....	42
3.3.3 Teste de sinergismo .....	44
3.3.4 Docking molecular .....	44
3.4 Discussão .....	49
3.5 Conclusão.....	52

Agradecimentos

Referências

<b>4. CONSIDERAÇÕES GERAIS .....</b>	<b>58</b>
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>60</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>61</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>67</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A microbiota bucal é colonizada por diferentes espécies de micro-organismos, de condições metabólicas totalmente distintas, cuja composição está diretamente relacionada a fatores sistêmicos inerentes ao hospedeiro (fisiológicos, imunológico e/ou hormonais) ou locais (região de isolamento, disponibilidade de oxigênio e nutrientes, pH e higiene local, entre outros).<sup>1</sup> Estima-se que mais de 500 espécies distintas de micro-organismos, entre fungos, bactérias, vírus e protozoários compõem a microbiota bucal dos seres humanos, sendo estes pertencentes aos três domínios existentes: Bactéria, Archea e Eukaria.<sup>1,2,3,4,5,6</sup>

Entre os fungos que compõe a microbiota natural dos seres humanos, as leveduras do gênero *Candida* spp. encontram-se presentes em cerca de 20-80% da população mundial, colonizando harmonicamente os tratos respiratório, gastrointestinal, vulvovaginal e mucosa bucal de seu hospedeiros sem ocasionar-lhes nenhum dano à saúde.<sup>7,8,9,10</sup> Sua presença na cavidade bucal não implica necessariamente o desenvolvimento de infecções, porém por ser um micro-organismo oportunista, pequenas mudanças nas condições de saúde do hospedeiro e expressão de fatores de virulência fúngico propiciam a transição da forma fúngica comensal para patogênica, desencadeando então o processo infeccioso denominado candidíase.<sup>8,9,10,11</sup>

Os mecanismos de patogenicidade de *Candida* spp. estão diretamente relacionados a capacidade de transformação da forma comensal para patogênica decorrente da expressão de múltiplos fatores de virulência em resposta as mudanças ambientais do hospedeiro ou fatores genéticos. Desta forma, a literatura relata um grande número de fatores de virulência relacionados ao estabelecimento e progressão da candidíase, como plasticidade fenotípica, produção e liberação de enzimas extracelulares, capacidade de aderência celular, formação de biofilme, expressão de genes resistentes a antifúngicos, entre outros.<sup>7,12,13</sup>

A plasticidade fenotípica de *Candida* spp. ocorre pelo caráter dimorfo que inúmeros fungos patogênicos apresentam, relacionado à sua habilidade de crescimento nas formas unicelular leveduriforme a multicelular filamentoso, passando

pelo estado transicional de tubo germinativo.<sup>7,12,13</sup> As estruturas de pseudo-hifas e hifas verdadeiras apresentam maior capacidade infectante quando comparadas às células leveduriformes de *Candida* spp., contudo ambas morfologias demonstram grande importância no estabelecimento e progressão do processo infeccioso, uma vez que é por meio das células leveduriformes que há eficiente propagação do micro-organismo e é por meio da forma filamentosa que há melhor capacidade invasiva às células do hospedeiro.<sup>10,13</sup>

A produção de enzimas extracelulares, como fosfolipases e proteases, é um fator de virulência de grande importância e eficácia no processo de disseminação da candidíase bucal, pois ocasionam danos às estruturas celulares e degradam substratos fisiologicamente importantes do sistema imunológico hospedeiro.<sup>7,12,14</sup> Constituem duas famílias de isoenzimas distintas que apresentam capacidade de penetração ao tecido hospedeiro por diferentes mecanismos de ação: as fosfolipases degradando fosfolipídios presentes na membrana plasmática celular e as proteases destruindo barreiras físicas da mucosa bucal, degradando imunoglobulinas e proteínas do sistema complemento e a matriz extracelular.<sup>7,12</sup>

A capacidade de aderência e invasão celular de tecidos hospedeiros e materiais inanimados por *Candida* spp. ocorre pela ação conjunta de proteínas especializadas, denominadas adesinas e invasinas, mediadoras de diferentes interações celulares entre a superfície hifal fúngica e o tecido hospedeiro. As adesinas melhores estudadas no processo de patogenicidade de *Candida* spp. em candidíase bucal são as proteínas de superfície celular da família ALS (*Agglutinin-Like Sequence*) e Hwp1; e as invasinas são Ssal (pertencente à família da proteína de choque térmico - Hsp 70) e ALS3, observadas no mecanismo de endocitose induzida (mediada por sua ligação a E-caderina presente em células epiteliais orais) e na invasão ativa (cujo seu envolvimento com outros mecanismos moleculares ainda não foram bem elucidados).<sup>7,13</sup>

A habilidade de formação de biofilme por *Candida* spp. é outro importante fator de virulência no estabelecimento da candidíase. Biofilmes são estruturas tridimensionais complexas formadas por leveduras, hifas e pseudo-hifas envoltas por uma matriz extracelular, que promovem acentuada resistência às respostas imunológicas do hospedeiro e ao tratamento antifúngico quando comparado as células planctônicas,

representando assim, um grave problema de relevância clínica no tratamento desta infecção micótica.<sup>10,13</sup>

Para tanto, outros fatores de virulência relacionados a patogenicidade de *Candida* spp. são relatados na literatura, como: a capacidade de adaptação e modulação ao pH local, flexibilidade metabólica na assimilação de nutrientes, adaptação fúngica ao estresse ambiental, captação de aminoácidos, metais (como ferro, zinco, cobre e manganês), carbono (C) e nitrogênio (N) pelo micro-organismo e produção de proteínas induzidas por choque térmico (Hsps) em resposta ao estresse local.<sup>13</sup>

A candidíase bucal, também denominada candidose bucal, é uma infecção micótica oportunista causada por fungos do gênero *Candida* que acomete a cavidade bucal de indivíduos imunocomprometidos. Tem como principal agente etiológico *Candida albicans*, entretanto, espécies não-albicans de importância clínica, como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae* também são relatadas como agentes causadores desta patologia.<sup>10,12</sup>

É uma doença que acomete diferentes localidades da boca e apresenta aspectos clínicos distintos que variam de acordo com tipo de infecção manifestada. Sua classificação pode ser do tipo primária ou secundária, exibindo-se nas formas aguda ou crônica, que variam de acordo com manifestações clínicas expressas pelo paciente.<sup>9</sup>

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que lesões bucais causadas por *Candida* spp. são facilmente manifestadas em pacientes submetidos a diferentes tipos de condições predisponentes, sejam eles fisiológicos, imunológicos ou de hábitos de vida. Um estudo realizado por Hartmann et al.<sup>15</sup>, com objetivo de avaliar a incidência de doenças micóticas em pacientes HIV positivos na cidade de Santo Angelo – RS, demonstrou alto percentual (53,3%) de positividade para *Candida* spp. em pacientes com idade entre 19 a 63 anos. Patil et al.<sup>16</sup>, relataram prevalência de 34% e 15%, respectivamente, de lesões do tipo estomatite protética e candidíase eritematosa, em pacientes geriátricos indianos.

Conhecida popularmente por sapinho, a candidíase pseudomembranosa é um tipo de candidíase bucal designada do tipo crônica que se manifesta pelo aparecimento

de placas amarelo-esbranquiçadas, de aspecto mole à gelatinoso, facilmente removíveis ao atrito físico. Apresenta-se em placas aderidas fracamente nas regiões do palato, língua, orofaringe e mucosa bucal, que ao extraídas mecanicamente evidenciam uma superfície eritematosa não ulcerada. Seu surgimento ocorre geralmente de forma assintomática em casos infecciosos leves, contudo em casos graves há queixas de sensibilidade, ardência e dificuldade de deglutição.<sup>17,18</sup>

A candidíase atrófica ou eritematosa, outro tipo de candidíase denominada do tipo aguda, se manifesta em persistência da forma pseudomembranosa, porém com região eritematosa mais abrangente. É um tipo secundário da infecção e demonstra-se sempre de forma sintomática, com presença de inflamação, sensibilidade intensa e atrofia das papilas linguais.<sup>19</sup> Sua prevalência ocorre principalmente em pacientes imunodeprimidos em consequência de doenças crônicas ou que fazem uso de antibioticoterapia de amplo espectro e por isso esse tipo de candidíase é denominado também de estomatite ou glossite por antibióticos.<sup>11,18,19</sup>

A candidíase atrófica crônica, também conhecida por estomatite ou inflamação protética ou de dentadura, é um tipo de candidíase do tipo crônica que se manifesta frequentemente em idosos usuários de próteses, sendo essa a única condição necessária para o surgimento do processo infeccioso. Apresenta como fatores etiológicos, associados ao uso da prótese dentária, o traumatismo crônico na superfície gengival alveolar decorrente de atritos físico da prótese com a mucosa gengival; utilização noturna, má adaptação e higienização precária da dentadura; hipersensibilidade ao material base da prótese dentária, entre outros.<sup>19,20,21</sup> As manifestações clínicas observadas neste tipo de candidíase são: vermelhidão intensa na superfície alveolar, de aspecto aveludado a pedregoso, com formação ou não de vesículas e erosões confluentes; podendo se manifestar nas formas circunscrita ou difusa com formação ou não de lesões ulcerativas. Os sintomas clínicos, algumas vezes, demonstrados neste tipo de candidíase são: dor, irritação e problemas de salivagem.<sup>17,19</sup>

Quanto a epidemiologia da candidíase atrófica crônica, um estudo realizado em João Pessoa-PB demonstrou prevalência de 35% da candidíase bucal do tipo estomatite protética em pacientes com faixa etária entre 21 a 90 anos, usuários de próteses parcial removível (59%) ou prótese total (42%), com predomínio do

diagnóstico para tal tipo de candidíase em pacientes do sexo feminino (77%).<sup>20</sup> Santos et al.,<sup>22</sup> em outro estudo realizado no nordeste brasileiro, demonstraram prevalência um pouco menor para lesões microbianas do tipo estomatite protética (27,3%) em pacientes idosos acompanhados por uma Unidade de Saúde no Estado da Bahia.

A candidíase hiperplásica, é um tipo de candidíase crônica que se manifesta geralmente de forma assintomática, mas com presença de lesões esbranquiçadas circunscritas, homogêneas, de superfície lisa a nodular, não removíveis ao atrito físico.<sup>2,11,23</sup> Apresenta lesões pequenas e translúcidas ou grandes e opacas que se parecem com placas leucoplásicas e que estão fortemente aderidas à mucosa bucal. É um tipo de manifestação incomum da candidíase bucal, mas quando presente, deixa sequelas como lesões residuais esbranquiçadas com possíveis alterações de malignidade decorrentes da infiltração profunda das hifas do fungo no tecido hospedeiro.<sup>11,18,19</sup>

Caracterizada pela persistência prolongada do processo infeccioso em membranas mucosas, em consequência da resistência aos antifúngicos convencionais utilizados no tratamento da doença, a candidíase mucocutânea, é um tipo de candidíase crônica de causa diversa, que está associada, muitas vezes, a problemas endócrinos desencadeados por uma série de síndromes autoimunes no paciente.<sup>11,17</sup> É uma forma de candidíase bucal grave, embora ocorra de forma esporádica, entretanto tem-se notado um padrão de herança autossômica recessiva em algumas famílias, evidenciando-se já nos primeiros anos de vida do indivíduo.<sup>18</sup>

Além das manifestações clínicas de candidíase relatadas acima, existem ainda dois tipos de candidíase bucais pouco mencionadas na literatura: a cheilo-candidíase caracterizada pelo aparecimento de lesões ulceradas de borda eritematosa na mucosa dos lábios superior e inferior e a candidíase crônica multifocal, caracterizada pelo aparecimento de placas eritematosas presentes em duas ou mais regiões da boca de pacientes fumantes do sexo masculino.<sup>11</sup>

A terapia medicamentosa para candidíase bucal dá-se inicialmente por antifúngicos de uso tópico como nistatina e miconazol e em caso de insucesso, se inicia o uso de antifúngicos de efeito sistêmico sendo a anfotericina B e alguns derivados azólicos exemplos de drogas sistêmicas.<sup>2,17</sup>

Como principal fármaco de escolha para o tratamento de candidíase bucal, a nistatina (Fig. 1) foi o primeiro antifúngico do grupo dos polienos a ser descoberto, ainda na década de 50, a partir de isolados gram-positivos *Streptomyces noursei*.<sup>24</sup> É um medicamento bastante utilizado nos dias de hoje, podendo ser encontrado nas formas de suspensão tópica ou comprimido nas concentrações que variam de 100.000 UI/mL a 500.000 UI/mL.<sup>17</sup>

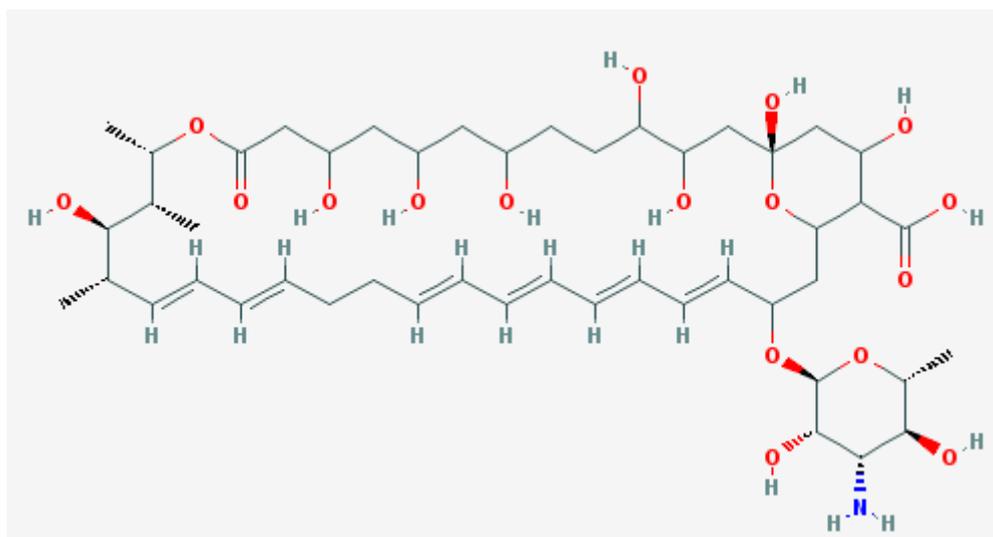


Figura 1: Estrutura molecular da nistatina. Fonte: PubChem

A atividade farmacológica da nistatina em células fúngicas se dá por meio da interação com o principal esteroide da membrana plasmática dos fungos, o ergosterol, alterando assim a permeabilidade e fluidez da membrana citoplasmática e ocasionando morte microbiana.<sup>9,11</sup> Outros antifúngicos também pertencentes ao grupo dos polienos são a natamicina e anfotericina B, conhecidos por atuar de forma fungicida e fungistática contra uma grande variedade de leveduras, sendo considerados antifúngicos de amplo espectro.<sup>25</sup>

O mecanismo de ação dos antifúngicos pertencentes ao grupo dos polienos ocorre devido grande afinidade que essas moléculas possuem ao ergosterol da membrana plasmática de *Candida*, formando complexos molécula/ergosterol e permitindo a criação de poros transmembranares, que possibilitam a saída de componentes citoplasmáticos importantes (proteínas, açúcares e íons, em especial íon potássio),

desencadeando desequilíbrio osmótico celular e conseqüentemente a morte do micro-organismo (Figura 2).<sup>24,25,26,27</sup>

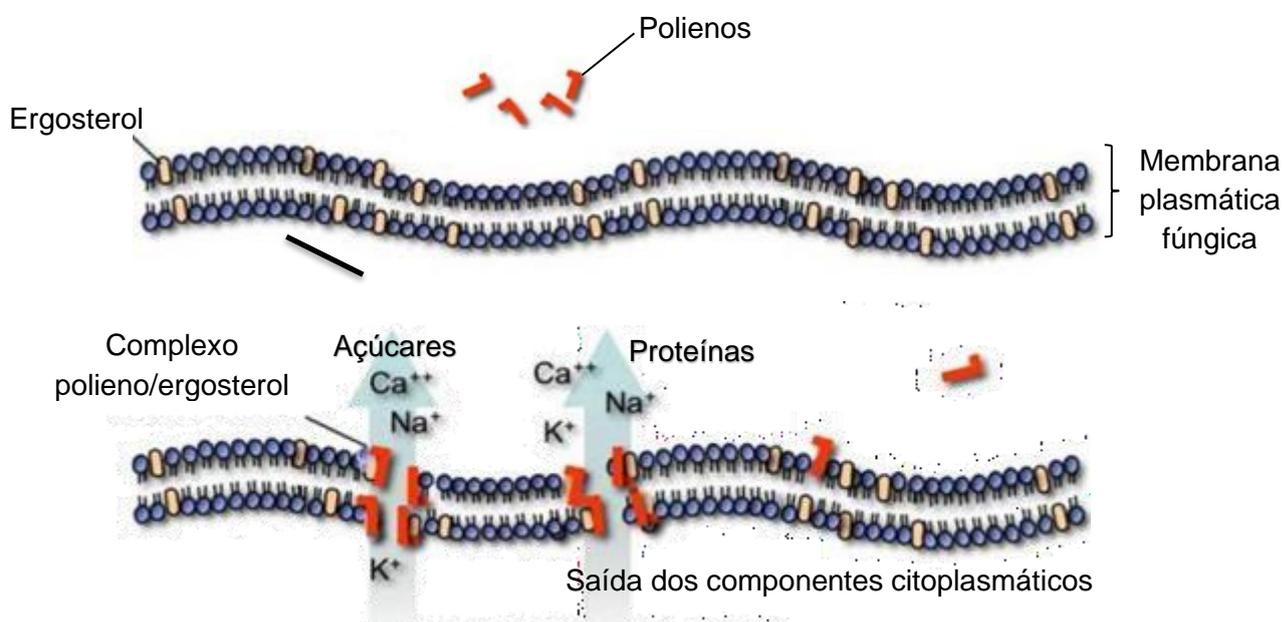


Figura 2: Mecanismo de ação dos antifúngicos poliênicos e formação de poros transmembranares. Fonte: Adaptado de Gonçalves, 2011.

Embora moléculas poliênicas apresentem grande afinidade ao ergosterol presente na membrana plasmática de *Candida*, elas podem também interagir com moléculas de colesterol da membrana plasmática das células humanas, causando danos a elas e produzindo efeito tóxicos sobre elas.<sup>25</sup>

Formando o grupo de maior número de antifúngicos sintéticos, as drogas azólicas ou simplesmente azóis, descobertas no final da década de 40, são prescritas para diferentes tipos de micoses até os dias de hoje.<sup>26</sup> São constituídas por moléculas unicamente sintéticas, de cadeia heterocíclica, aromáticas, com presença de dois ou três átomos de nitrogênio na cadeia alifática do grupo fenil (Figura 3). Estão divididos em duas famílias, os imizadóis (dois átomos de nitrogênio) (Fig. 3 a) e os triazóis (três átomos de nitrogênio) (Fig. 3 b), sendo o miconazol (pertencente à família dos imidazóis) um dos fármacos mais comum na prescrição do tratamento de candidíases bucais.<sup>25</sup>

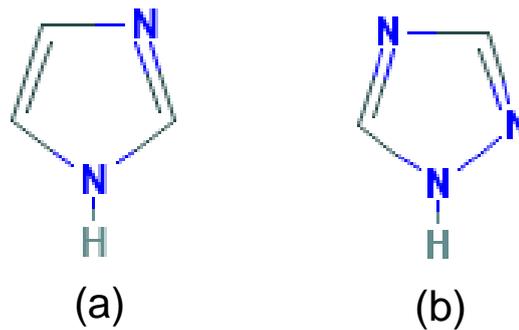
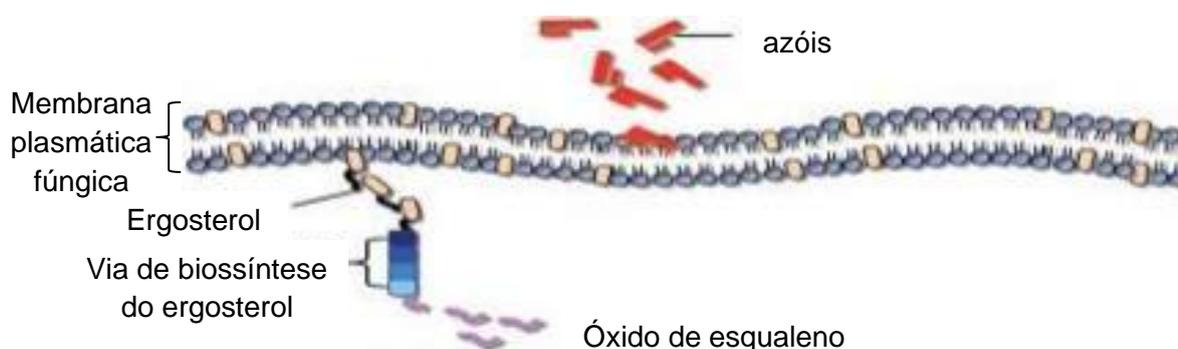


Figura 3: Estrutura molecular dos azóis: a) Imidazóis, com dois átomos de nitrogênio ligado ao anel aromático fenil. b) Triazóis, com três átomos de nitrogênios ligados ao anel aromático fenil. Fonte: PubChem.

São drogas inibidoras da biossíntese dos esteróis na membrana plasmática fúngica, comprometendo sua permeabilidade e fluidez e impedindo assim o crescimento do micro-organismo (Figura 4). Apresentam baixa toxicidade às células humanas, sendo prescritas no tratamento de micoses superficiais à sistêmicas causada por fungos filamentosos ou leveduriformes.<sup>25,26</sup>

Seu mecanismo de ação baseia-se na capacidade de ligação as moléculas de ferro ( $Fe^{+}$ ) da porção heme da enzima esterol 14- $\alpha$ -desmetilase, inativando, portanto, a síntese do ergosterol. A inativação da enzima 14- $\alpha$ -desmetilase, que atua na desmetilação oxidativa do lanosterol (intermediário) à ergosterol, aumenta o acúmulo de metilesteróis (produto tóxico as células fúngicas) no interior das células ocasionando declínio do ergosterol na membrana plasmática, gerando mudanças estruturais e de integridade celular, impedindo assim o crescimento fúngico.<sup>28,29</sup>



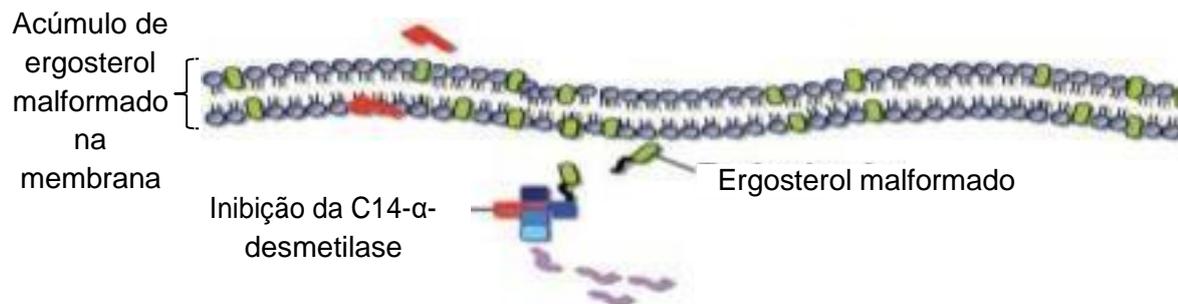


Figura 4: Mecanismo de ação das drogas azólicas na síntese do ergosterol da membrana plasmática fúngica. Fonte: Adaptado de Rezende et al., 2017.

O aumento da resistência microbiana, em escala mundial, aos agentes terapêuticos disponíveis no mercado vem preocupando cada vez mais profissionais e órgãos da saúde, e alertando a comunidade para a necessidade de novas políticas públicas que combata ou ao menos diminua a frequência desse fenômeno. Fatores como o grande número de pacientes imunocomprometidos e exposição prolongada aos antifúngicos convencionais no tratamento de infecções micóticas tem propiciado aumento na resistência fúngica de *Candida* spp. às terapias medicamentosas convencionais.<sup>30</sup>

O fenômeno de resistência fúngica às terapias micóticas tradicionais, pode ser causado por fontes associadas a insensibilidade microbiana à terapia medicamentosa (resistência microbiológica) ou pela ineficácia do tratamento recomendado, mesmo que este seja o adequado (resistência clínica).<sup>31</sup> A resistência fúngica do tipo microbiológica pode ser dividida em duas categorias: a intrínseca, que é quando o micro-organismo é naturalmente resistente a terapia antifúngica mesmo antes de exposta a ela, e a adquirida, que é quando há mutações gênicas no micro-organismo somente após seu contato com o antifúngico. A resistência clínica pode ser adquirida por múltiplos fatores, que vão muito além de questões relacionadas a resposta micro-organismo/antifúngico, na verdade, é um conjunto de elementos associados a resistência antimicrobiana do fungo, estado imunológico do hospedeiro e comportamento farmacológico do agente terapêutico utilizado.<sup>31,32</sup>

Desta forma, a necessidade de novas terapias alternativas que supram as limitações da terapia antifúngica tradicional tem possibilitado o crescente número de

pesquisas utilizando conhecimentos etnobotânicos de plantas medicinais, terapias combinadas e fitoterápicos como recursos de melhoria ao tratamento de doenças micóticas. Considerado rico em diversidade biológica, o Brasil tem grande potencial na descoberta de novos fármacos com ação antimicrobiana, uma vez que o país possui ampla diversidade vegetal e vasto conhecimento científico na busca de novas moléculas bioativas capazes de atuar em diversas afecções bucais.<sup>33</sup>

Estudos etnobotânicos têm demonstrado que espécies vegetais encontradas no Nordeste brasileiro são relatadas com propriedades farmacológicas para o tratamento de infecções bucais, entre elas *Punica granatum* L. (romã), *Anacardium occidentale* L. (cajueiro roxo), *Abarema cochliacarpus* (barbatimão) e *Plectranthus amboinicus* Lour. Spreng. (hortelã da folha graúda) utilizadas no tratamento de diversas patologias orais por demonstrar ação anti-inflamatória, antimicrobiana, analgésica e cicatrizante.<sup>34,35,36,37</sup>

Na Paraíba, estudos etnobotânicos demonstraram que além das espécies vegetais declaradas acima, ainda há relatos da utilização das espécies *Allium sativum* L. (alho) para dor de dente; *Psidium guajava* (goiabeira) e *Tabebuia avellanedare* (Ipê-roxo) para gengivite e inflamações em geral; e *Spindias urundeuva* (umbuzeiro) para amigdalite.<sup>38,39</sup>

Santos et al.<sup>40</sup> demonstrou que espécies como *Pithecelobium avaremotemo* Mart. (babatenon), *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira), *Anacardium occidentale* L. (cajueiro roxo), *Bumelia sartorum* Mart. (quixaba) são amplamente utilizadas no tratamento de infecções bucais na capital paraibana, indicadas principalmente pela ação anti-inflamatória e cicatrizantes.

Sendo assim, relata-se na literatura que a utilização de produtos naturais e da terapia combinada frente diferentes fungos patogênicos é uma alternativa viável para o tratamento da candidíase bucal<sup>41,42,43,44</sup>

Considerado um importante recurso para limitações da monoterapia convencional no tratamento da candidíase bucal, a terapia combinada é uma estratégia que visa possibilitar a interação de duas ou mais moléculas, buscando efeito sinérgico entre elas, para proporcionar alguns benefícios em comparação terapia tradicional.<sup>45</sup> É uma técnica que procura sempre melhorar a eficácia terapêutica, aumentando a

sensibilidade do micro-organismo e minimizando o desenvolvimento e evolução da resistência fúngica ao tratamento indicado, com redução de doses e conseqüentemente toxicidade aos fármacos, garantindo assim maior segurança, tolerabilidade e melhorias na taxa de cura do paciente.<sup>46</sup>

Gadea e Mensa<sup>45</sup> descreve que as possíveis interações das moléculas antifúngicas na terapia combinada são: melhor penetração de um fármaco na célula fúngica graças à atuação de outro na membrana celular do micro-organismo; alterações nas bombas de efluxo capazes de eliminar os antifúngicos no interior celular; ação conjunta e sequencial das drogas nas mesmas cadeias biossintéticas vitais a sobrevivência fúngica; bloqueio simultâneo de múltiplos alvos celulares; e aceleração da resposta terapêutica do hospedeiro ao tratamento indicado.<sup>45</sup> Contudo, os autores expõem ainda que nem sempre o sinergismo entre as moléculas é o resultado alcançado e que limitações como aumento da toxicidade e competitividade entre os fármacos são frequentes.

Alguns trabalhos mostram o efeito sinérgico de antifúngicos convencionais e óleos essenciais sobre cepas de *Candida* spp.<sup>47,48,49</sup> Castro et al.<sup>47</sup>, demonstraram que o timol, principal monoterpene encontrado no óleo essencial de *Thymus vulgaris* (tomilho), associado a nistatina apresentou atividade sinérgica sobre cepas de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, consideradas importantes agentes etiológicos da candidíase bucal.

Silva et al.<sup>48</sup>, demonstraram que o óleo essencial de *Cloriandrum sativum* (coentro), quando associado a anfotericina b, apresentou efeito sinergismo sobre *C. albicans* e aditividade sobre *C. tropicalis*.

Essid et al.<sup>49</sup>, avaliaram atividade anti-*Candida* de dez óleos essenciais (OE) e perceberam que os OE de *Cinnamomum verum* (canela), *Thymus capitatus* (tomilho), *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia) e *Pelargonium graveolens* (gerânio) demonstraram efetiva atividade sobre diferentes espécies do gênero. Quanto a atividade sinérgica, os autores perceberam que óleos essenciais de *P. graveolens* e *C. verum* em associação ao fluconazol apresentaram sinergismo positivo, com valor da Concentração Inibitória Fracionada - CIF < 0,5, frente as cepas testadas (inclusive àquelas resistentes a este antifúngico) e concluíram que o mecanismo de ação de *C. verum* (canela)/fluconazol ocorreu pela inibição à biossíntese do ergosterol da

membrana plasmática fúngica e que *P. graveolens* (gerânio)/fluconazol atuou alterando a permeabilidade da parede celular de *Candida*.

Os óleos essenciais são utilizados na etnomedicina há bastante tempo como antifúngicos eficazes e seguros contra infecções por *Candida*.<sup>50</sup> Por definição, óleos essenciais são misturas complexas de compostos naturais que contém diversos fitoconstituintes químicos, polares e apolares, oriundos do metabolismo secundários de plantas e que demonstram inúmeros propriedades biológicas.<sup>50</sup> Apresentam, do ponto de vista farmacológico, propriedades anti-inflamatórias, analgésicas, antioxidantes, antitumoral, antiparasitárias, antimicrobiana, entre outras, que variam de acordo com o perfil fitoquímico demonstrado no produto extraído da planta.<sup>49,51,52,53,54</sup>

Encontrado na grande maioria dos óleos essenciais, porém em pequenas quantidades, os fenilpropanóides constituem um grupo de fitoquímicos derivados da fenilalanina que desempenham importantes funções na sobrevivência, estrutura e defesa dos organismos vegetais.<sup>51,55</sup> São sintetizados a partir da desaminação da L-fenilalanina em ácido trans-cinâmico pela enzima fenilalanina amônia-liase (PAL), através da via do ácido chiquímico, com posterior redução a aldeídos e outras reações dependentes de enzimas que ocorrem sob condições de estresse ambiental.<sup>56,57</sup> Demonstrem como estrutura química esqueleto carbônico formado por três átomos de carbonos ligados a um anel aromático fenil; sendo alguns de seus representantes o eugenol, isoeugenol, metil eugenol, chavicol, safrol, dilapiol, entre outros.<sup>58</sup>

O isoeugenol, quimicamente denominado 4-propenil-2-metoxifenol (Fig. 5), é um composto aromático pertencente ao grupo dos fenilpropanóides naturalmente presente em especiarias como *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia), *Myristica fragrans* (noz-moscada), *Ocimum basilicum* L. (manjeriço) e *Laurus nobilis* L. (louro).<sup>59,60,61,62</sup> É um isômero de posição do eugenol (figura 6) quanto a dupla ligação C=C da cadeia alifática, com fórmula molecular C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>, peso molecular 164, 204 g/mol e densidade 1,08 g/cm<sup>3</sup>. Possui características físicas: cor amarelo esbranquiçado, odor característico, ligeiramente solúvel em água, porém bastante solúvel em álcool éter e solventes orgânicos, com ponto de ebulição 266 °C e ponto de fusão -10 °C.<sup>63</sup> É um composto ainda pouco relatado na literatura quanto atividade antifúngica, visto que a grande maioria dos estudos, principalmente na odontologia,

estão centrados nesta propriedade presente no eugenol; contudo, trabalhos evidenciam a capacidade antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral e analgésica do isoeugenol.<sup>60,62,64,65</sup>

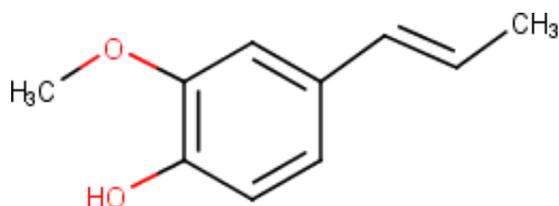


Figura 5: Estrutura molecular do isoeugenol.

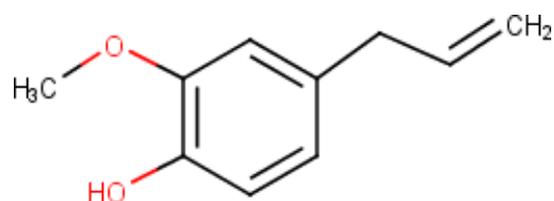


Figura 6: Estrutura molecular do eugenol.

Em relação a atividade antifúngica, Peixoto et al.<sup>60</sup> avaliaram a capacidade anti-*Candida*, antibiofilme e mecanismo de ação do óleo essencial de *L. nobilis* (louro) e verificaram que o referido produto apresentou atividade fungicida frente diferentes espécies de *Candida* isoladas da cavidade oral, bem como interferiu na adesão e formação do biofilme destas espécies. Os autores relataram ainda, que o composto majoritário encontrado no OE de *L. nobilis* foi o isoeugenol (53,5%) e propuseram que o mecanismo de ação do óleo demonstrou-se pela capacidade de interferência à biossíntese da parede celular fúngica e/ou pelo aumento da permeabilidade iônica da membrana plasmática fúngica.

Galluci et al.<sup>64</sup>, demonstraram *in vitro* que o fitoconstituente isoeugenol foi capaz de matar cepas de *C. albicans*, *C. dublinienses*, *C. krusei* e *C. tropicalis* resistentes ao fluconazol e relataram que o mecanismo de ação dos diferentes compostos fenólicos, entre eles o isoeugenol, ocorrem devido a capacidade que essas moléculas têm de perturbar a integridade da membrana plasmática do fungo.

Bhatia et al.<sup>66</sup>, avaliando atividade *in vitro* do isoeugenol sobre 28 isolados clínicos, susceptíveis (17) e resistentes (11) ao fluconazol, e três padrões de *Candida* spp., obtiveram valores da concentração inibitória mínima (CIM) que variaram entre 100 – 250 µg/mL. O estudo mostrou ainda que o fitocomposto em questão interferiu no crescimento de *Candida* spp. inibindo o funcionamento da bomba de prótons presente na membrana plasmática fúngica.

Considerando a importância clínica e epidemiológica da candidíase bucal e o aumento das limitações nas terapias sintéticas convencionais, o presente estudo buscou investigar, *in vitro*, a atividade antifúngica do fitoconstituente isoeugenol contra leveduras do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal, bem como avaliar os possíveis efeitos do produto sobre a micromorfologia das células e seu efeito inibitório, pelo método de *checkerboard*, em combinação com o antifúngico padrão nistatina.

## 2. CAPÍTULO 1

O manuscrito a seguir foi submetido para publicação no periódico “***Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine***”, ISSN: 1741-4288/ Qualis Capes Odontologia B1 e encontra-se em análise.

## Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine

### Estudo da Atividade Antifúngica do Isoeugenol e sua Interação com Nistatina Sobre Células de *Candida tropicalis* e *Candida glabrata* Isolados da Cavidade Bucal: Um estudo *in vitro*

Daianne S. Medeiros,<sup>1</sup> José K. O. Júnior,<sup>1</sup> Jeferson R. Nóbrega,<sup>1</sup> Edeltrudes de O. Lima.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB/58051-900, Brasil.

Correspondência endereçada a Daianne S. Medeiros; daianne@ufpb.br

#### Resumo

A candidíase bucal é uma infecção fúngica oportunista causada por leveduras do gênero *Candida* que acomete geralmente pacientes imunocomprometidos. Tem como principal agente etiológico *Candida albicans*, entretanto espécies não-*albicans* como *C. tropicalis* e *C. glabrata* têm sido frequentemente isoladas nesta patologia. O presente estudo teve como objetivo avaliar atividade antifúngica do isoeugenol, sua ação sobre a micromorfologia de *C. tropicalis* e *C. glabrata* isolados da cavidade bucal, bem como analisar seu efeito combinatório com antifúngico padrão nistatina. Os testes de atividade antifúngica do isoeugenol foram determinados por microdiluição em caldo. A avaliação do efeito do isoeugenol sobre a micromorfologia de estruturas de patogenicidade, blastoconídios e pseudo-hifas, de *C. tropicalis* foi determinada. O índice da concentração inibitória fracionada (ICIF) do isoeugenol e nistatina foi determinado utilizando o método de *checkerboard*. O isoeugenol apresentou efeito antifúngico, com valores da CIMs entre 128 µg/mL e 256 µg/mL para *C. tropicalis* e *C. glabrata*. A CFM do isoeugenol variou entre 128 µg/mL e 512 µg/mL para *C. tropicalis* e 128 µg/mL e 256 µg/mL para *C. glabrata*. O isoeugenol causou alterações na micromorfologia dos isolados avaliados. A combinação do isoeugenol com a nistatina demonstrou atividade sinérgica em *C. tropicalis* LM-211 com valor ICIF=0,25. Este estudo revelou que o isoeugenol é um fitocomposto com efetiva ação antifúngica contra *Candida* spp. e tem grande potencial a ser um futuro antifúngico.

## 1. Introdução

A candidíase bucal é uma infecção fúngica oportunista ocasionada por leveduras do gênero *Candida* que constituem naturalmente a microbiota normal de seres humanos [1]. É uma doença de etiologia multifatorial podendo estar relacionada a condições predisponentes de âmbito local, como uso de próteses dentárias, má higienização, mudança de pH e problemas de salivação; ou sistêmicos como doenças endócrinas, uso de tratamentos quimioterápicos ou radioterápicos, mudanças imunológicas, fisiológicas e deficiências nutricionais [2]

*Candida albicans* é a espécie comumente conhecida como o agente etiológico mais virulento do gênero *Candida*, entretanto com o advento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Aids) nas últimas décadas e a utilização disseminada de antibioticoterapias, mudanças nos padrões epidemiológicos da candidíase tem ressaltado que espécies não-*albicans* como *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*, tidas emergentes, vem sendo mais frequentemente isoladas nesta patologia [3-7].

Entre o grupo não-*albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* são as espécies consideradas mais virulentas no estabelecimento da candidíase bucal, realidade relacionada a fatores de virulência expressos por essas espécies [8]. Tais fatores de virulência incluem alta capacidade de adesão a células epiteliais e materiais inanimados, produção de enzimas extracelulares capazes de degradar substratos fisiologicamente importantes ao hospedeiro e rápido desenvolvimento e expressão de genes de resistência aos antifúngicos atualmente presentes no mercado [8-10]

Na odontologia, a nistatina tem sido amplamente utilizada no tratamento de lesões teciduais por *Candida* spp., apesar de outras drogas de uso tópico (clotrimazol e miconazol) ou sistêmico (fluconazol, cetroconazol e anfotericina B) também serem prescritas no tratamento da candidíase bucal [11-15].

Entretanto, com o aumento da resistência fúngica aos fármacos e as limitações apresentadas pela monoterapia convencional tem aumentado a busca de novas moléculas biologicamente ativas contra *Candida* spp. e impulsionado a procura de alternativas terapêuticas que possibilitam contornar restrições encontradas no tratamento da candidíase bucal [16].

Entre as novas alternativas terapêuticas no tratamento da candidíase bucal, a utilização de produtos naturais como fonte de moléculas farmacologicamente ativas e sua ação combinada com drogas antifúngicas presentes no mercado têm ganhado grande destaque em diversos estudos da área, sendo os fenilpropanóides um grupo de moléculas amplamente utilizados na odontologia [16-20].

O isoeugenol (4-propenil-2-metoxifenol) (figura 1) é um fitocomposto derivado dos fenilpropanóides majoritariamente presente em óleos essenciais de *Syzygium aromaticum*, *Myristica fragrans*, *Ocimum basilicum* L. e *Laurus nobilis* L. e que tem demonstrado propriedades antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral e analgésica [21-26]. É um composto isômero do eugenol (figura 2), com sua atividade antifúngica ainda pouco relatada na literatura. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo analisar a atividade antifúngica do isoeugenol, bem como sua ação sobre a micromorfologia de *C. tropicalis* e *C. glabrata* isoladas da cavidade bucal e verificar seu efeito sinérgico em combinação ao antifúngico nistatina.

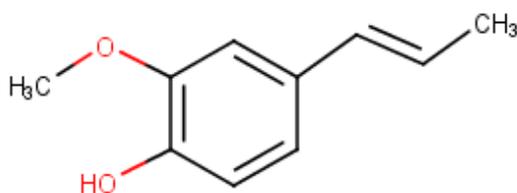


Figura 1: Esqueleto molecular do isoeugenol.

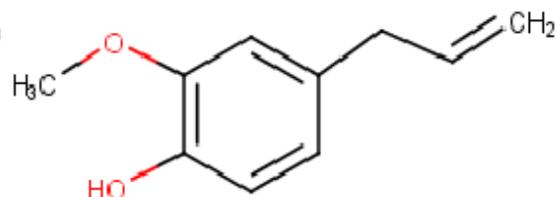


Figura 2: Esqueleto molecular do eugenol.

## 2. Materiais e Métodos

2.1 Substâncias padrão, fitoconstituente: As substâncias obtidas comercialmente neste estudo foram: isoeugenol (Sigma aldrich®, São Paulo, SP, Brasil), nistatina (Fragon®, São Paulo, SP, Brasil), dimetilsulfóxido (DMSO) (Labsynth produtos para laboratórios. Ltd., Diadema, SP, Brasil) e Tween-80 (Vetec Fine Chemicals Ltd., Duque de Caxias, RJ, Brasil).

2.2 Meios de cultura: Para avaliação da atividade antifúngica dos compostos foram utilizados RPMI 1640 L-glutamato sem bicarbonato de sódio (Sigma aldrich®, São Paulo, SP, Brasil) e Ágar Sabouraud Dextrose (Difco®, USA, França). Os meios de cultura foram devidamente preparados conforme as instruções do fabricante.

2.3 Cepas fúngicas e preparação do inóculo: Foi utilizado neste trabalho o total de 13 isolados de *Candida* spp., sendo 7 clínicos (LM-211, LM-02, LM-82, LM-96, LM-34, LM-77, LM-100) e um padrão ATCC-13803 de *C. tropicalis* e 4 isolados clínicos (LM-116, LM-302, LM-17, LM-106) e um padrão ATCC-90030 de *C. glabrata*. Todos pertenciam a coleção de micologia do Laboratório de Pesquisa: Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (DF/CCS/UFPB).

As cepas foram conservadas em Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) a 4 °C e a 35 °C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) por 24h para preparação dos inóculos e realização dos testes *in vitro*.

As suspensões microbianas foram preparadas utilizando 5 mL de solução salina estéril a 0,9% (Farmax, Amaral, Divinópolis, MG, Brasil) e agitada com auxílio de vórtex (Fanem Ltda., Guarulhos, SP, Brasil) por 15 segundos.

Após agitação a densidade celular foi avaliada e padronizada, utilizando sulfato de bário a 0,5 da escala de McFaland que corresponde a  $10^6$  Unidades Formadoras de Colônia por milímetro (UFC/mL). Para obtenção do inóculo a concentração  $10^5$  UFC/mL, utilizadas neste estudo, diluiu-se a suspensão na proporção 1:10. A concentração final obtida foi de  $1-5 \times 10^5$  UFC/mL e a confirmação realizada pela contagem de células em câmara de Neubauer [27-31].

2.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM): A Concentração Inibitória Mínima (CIM) do isoeugenol foi determinado pelo método de microdiluição em caldo realizada em duplicata utilizando placas de 96 poços de fundo redondo (Kasvi®, Itália) [28, 30, 32].

Foi adicionado inicialmente aos poços 100  $\mu\text{L}$  de caldo RPMI-1640 (Sigma-Aldrich®/São Paulo/Brasil) duplamente concentrado e acrescentado, em seguida, 100  $\mu\text{L}$  do produto teste. Foi realizado microdiluições em série, em que uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  do poço contendo meio mais concentrado foi transferida ao poço subsequente menos concentrado, nas concentrações de 1024  $\mu\text{g/mL}$  a 4  $\mu\text{g/mL}$ .

Por fim, foi adicionado aos poços 10 µL do inóculo de *Candida sp.*, de forma que cada coluna representava uma cepa diferente.

Em paralelo ao teste, foi realizado controle do meio, de viabilidade das cepas em meio líquido e susceptibilidade ao antifúngico padrão nistatina 100 UI às mesmas condições do ensaio. As placas foram incubadas a 35° C ( $\pm 2$  °C) por 24 a 48 horas e posteriormente analisadas visualmente para verificação da formação ou não de “botões” de células no fundo dos poços. A CIM dos produtos foi determinada como a menor concentração do produto capaz de inibir visualmente o crescimento fúngico em comparação com os controles.

Para interpretação da atividade antimicrobiana foi utilizado os seguintes valores padrão para CIM: <100 µg/mL (atividade boa/forte); 100 - 500 µg/mL (atividade moderada); 500 – 1000 µg/mL (atividade fraca) e CIM> 1000 µg/mL (inatividade) [35].

2.5 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM): Após a determinação da CIM, alíquotas de 10 µL do sobrenadante dos poços equivalente a CIM, CIM X2 e CIM X4 foram retiradas e repassadas para placa de microdiluição, de 96 poços com fundo redondo (Sigma-Aldrich®/São Paulo/Brasil), contendo 100 µL de RPMI 1640 [32,33]. As placas foram incubadas em estufa a 35 °C ( $\pm 2$  °C) por um período de 24 - 48h. Por fim, a leitura da placa foi realizada visualmente e a CFM determinada como a menor concentração dos produtos capaz de inibir o crescimento fúngico. Os ensaios foram realizados em duplicata e os valores expressos em média aritmética. A relação CFM/CIM foi calculada para determinar ação fungicida (CFM/CIM <4) ou fungistática (CFM/CIM  $\geq 4$ ) [36].

2.6 Ação dos compostos sobre a micromorfologia de *C. tropicalis*: As alterações morfológicas, ou não, das leveduras de *C. tropicalis* LM-211 e ATCC 13803, submetidas a nistatina e isoeugenol, foram verificadas pela técnica de microcultivo em câmara úmida utilizando meio Ágar-Fubá-Tween 80 sólido [19]. Alíquotas de 3mL de Ágar-Fubá-Tween 80 líquido, contendo substância teste na concentração da CIM, CIM X2 e CIM X4 foram despejados em lâmina de vidro apoiada sobre um suporte situado dentro da placa de Petri para solidificar. Após solidificação do meio, repiques recentes (em ASD por 24h à 35 °C  $\pm 2$ °C) foram semeadas na lâmina em formato de estrias e a placa tampada e incubada a temperatura de 35 °C ( $\pm 2$  °C)

por 24h a 48 horas. A umidade do interior da placa foi mantida por papel filtro embebido em água destilada estéril.

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico comum, em aumento de 400x para observação da formação, ou não, de estruturas características como blastoconídios e pseudo-hifas. Foi realizado a contagem das estruturas formadas e estas foram fotodocumentadas.

2.7 Estudo de associação *in vitro*: O ensaio de susceptibilidade da interação do isoeugenol com nistatina (100 UI) foi realizado pela técnica de *checkerboard* em microdiluição em caldo.

Para realização deste ensaio, foi adicionado 100 µL de Caldo Sabouraud Dextrose, em placa de 96 poços de fundo redondo (Kasvi®/Itália), seguido de 50 µL do isoeugenol nas concentrações CIM ÷ 8; CIM ÷ 4, CIM ÷ 2, CIM, CIM x 2, CIM x 4 e CIM x 8 (linhas verticais), 50 µL da nistatina (100 UI) nestas mesmas concentrações nas linhas horizontais e 10 µL da suspensão fúngica de *C. tropicalis* LM-211 e ATCC 13803 e *C. glabrata* LM-116 e ATCC 90030 em todos os poços. Em seguida, as placas foram tampadas e incubadas a 35 °C ± 2 °C por 72 h. [17, 37]

O ICIF (Índice de Concentração Inibitória Fracionada) foi determinado pelo somatório do ICIF dos produtos testes (ICIF<sup>A</sup>) com o ICIF dos antifúngicos licenciados padrões (ICIF<sup>B</sup>). Por sua vez, os valores do ICIF<sup>A</sup> ou <sup>B</sup> foram determinados através da relação da CIM<sup>A</sup> ou <sup>B</sup> combinados/CIM<sup>A</sup> ou <sup>B</sup> sozinhos (equação 1), sendo considerados os seguintes valores de referência: ICIF ≤ 0,5 = sinergismo; 0,5 > ICIF < 1 = aditividade; 1 ≥ ICIF < 4 = indiferença; e ICIF ≥ 4 = antagonismo [38].

Fórmula utilizada para calcular ICIF:

$$\sum \text{ICIF} = \text{CIF}^A + \text{CIF}^B = \frac{\text{CIM A}}{\text{CIM a}} + \frac{\text{CIM B}}{\text{CIM b}} \quad (1)$$

Em que:

CIM A = CIM da combinação das substâncias testes com antifúngico

CIM a = CIM das substâncias teste isoladas

CIM B = CIM do antifúngico na combinação com as substâncias testes

CIM b = CIM do antifúngico isoladas

### 3. Resultados e Discussão

Os resultados da atividade antifúngica do isoeugenol frente a *C. tropicalis* e *C. glabrata* estão registrados nas tabelas 1 e 2, respectivamente. Pode-se observar que, o isoeugenol apresentou atividade antifúngica moderada contra *C. tropicalis*, com valores da CIM<sub>88%</sub> de 128 µg/mL (tabela 1) e *C. glabrata* com CIM<sub>60%</sub> também na concentração de 128 µg/mL (tabela 2). A nistatina demonstrou forte atividade antifúngica em comparação ao isoeugenol frente a todos isolados de *Candida* com CIM = 8 µg/mL para *C. tropicalis* e CIM = 2 µg/mL para *C. glabrata*. O resultado de esterilidade do meio não demonstrou nenhum crescimento fúngico e de viabilidade das cepas nenhuma inibição de crescimento. Gallucci et al. [25] determinaram que a CIM do isoeugenol capaz de inibir o crescimento de cepas clínicas de *C. tropicalis* resistentes ao fluconazol e anfotericina B foi de 0,55 mg/mL<sup>1</sup>.

Bhatia et al. [39] observaram que a CIM do isoeugenol sobre *Candida* spp. sensíveis e resistentes ao miconazol variou entre 100-200 µg/mL e 100-200 µg/mL, respectivamente. Peixoto et al. [22], determinaram que a CIM do óleo essencial de *Laurus nobilis* Linnaeus (louro) variou entre 200-500 µg/mL contra *C. glabrata* e *C. tropicalis* isolados da cavidade bucal. Os autores relataram o isoeugenol como fitocomposto majoritário (53,5%) do óleo essencial de *L. nobilis*. Nossos resultados demonstraram valores ainda melhores, com CIM entre 128-256 µg/mL para *C. tropicalis* e *C. glabrata*, conforme mostra a tabela 1.

Estudos anteriores revelaram que o isoeugenol foi capaz de inibir o crescimento fúngico de *Fusarium verticillioides* com CIM de 0,40 mM ( $\cong$  66 µg/mL) [40] e *Aspergillus parasiticus* com CIM de 1,26 mM ( $\cong$  207 µg/mL) [41], com sua atividade antifúngica concentração dependente.

Em nosso trabalho a CFM das amostras com isoeugenol apresentaram valores idênticos a suas respectivas CIM em dois isolados clínicos de *C. tropicalis* (LM-77, LM-100) e ATCC 13803; CIM X 2 nos isolados LM-211 e LM-02; e CIM X 4 em LM-82, LM-96 e LM-34. A CFM de todos os isolados de *C. glabrata* foram idênticos a suas respectivas CIM. Em *C. tropicalis* os valores da CFM da nistatina

demonstraram ser idênticos a suas CIM em seis isolados e 4x vezes maior nas duas outras cepas analisadas (tabela 1); enquanto que para *C. glabrata* os valores da CFM foram idênticos a CIM em todos os isolados (tabela 2). De acordo com Sindique et al. [36] um composto possui ação fungicida quando a relação CFM/CIM for <4 e fungistática quando CFM/CIM for ≥4. Nossos resultados mostraram que o isoeugenol possuiu ação fungicida em 60% dos isolados de *C. tropicalis* e 100% dos isolados de *C. glabrata* avaliados no estudo. Os dados deste estudo corroboram com os achados por Peixoto et al. [22] em que a CFM correspondeu a sua CIM do OE de *L. nobilis* Linnaeus frente cepas de *C. tropicalis* E *C. glabrata* da cavidade bucal.

Tabela 1: Resultados da relação CIM, CFM e CFM/CIM do isoeugenol, nistatina e controle de esterilidade e viabilidade das cepas frente *C. tropicalis*. A CIM e CFM apresentam valores expressos em µg/mL.

C.	Isoeugenol (µg/mL)			Atividade Antifúngica	Nistatina (µg/mL)			Controles	
	CIM	CFM	CFM/CIM		CIM	CFM	CFM/CIM	Meio de cultura	Micro-organismos
<i>tropicalis</i>									
LM-211	128	256	2	Fungicida	8	8	1	-	+
LM-02	128	256	2	Fungicida	8	8	1	-	+
LM-82	128	512	4	Fungistática	8	8	1	-	+
LM-96	128	512	4	Fungistática	8	8	1	-	+
LM-34	256	512	4	Fungistática	8	8	1	-	+
LM-77	128	128	1	Fungicida	8	16	2	-	+
LM-100	128	128	1	Fungicida	8	8	1	-	+
ATCC 13803	128	128	1	Fungicida	8	8	1	-	+

+: Crescimento fúngico; -: Ausência de crescimento fúngico.

A avaliação das possíveis interferências do isoeugenol e nistatina na micromorfologia de *C. tropicalis* ATCC 13803 e LM-211, por microscópio óptico comum, revelou crescimento de estruturas de patogenicidade, blastoconídios, em todas as amostras nas concentrações CIM, CIM X 2, CIM X 4 e controle. O número de blastoconídios em ambas amostras foi consideravelmente menor na presença da nistatina e do isoeugenol em comparação ao controle nas três concentrações avaliadas. Em relação a formação de pseudo-hifas, não foi constatado sua presença nas concentrações da CIM, CIM x 2 e CIM x 4 do isoeugenol e CIM X 2

e CIM x 4 da nistatina (Figura 3). Dessa forma, nosso estudo demonstrou que o isoeugenol foi capaz de inibir o crescimento de estruturas de virulência em *Candida* sp.

Tabela 2: Resultados da relação CIM, CFM e CFM/CIM do isoeugenol, nistatina e controle de esterilidade e viabilidade das cepas frente *C. glabrata*. A CIM e CFM apresentam valores expressos em µg/mL.

C.	Isoeugenol (µg/mL)			Atividade Antifúngica	Nistatina (µg/mL)			Controles	
	CIM	CFM	CFM/CIM		CIM	CFM	CFM/CIM	Meio de cultura	Micro-organismos
<i>glabrata</i>									
LM-116	128	256	2	Fungicida	2	2	1	-	+
LM-302	128	256	2	Fungicida	2	2	1	-	+
LM-17	128	512	4	Fungicida	2	2	1	-	+
LM-106	256	256	1	Fungicida	2	2	1	-	+
ATCC 90030	256	256	1	Fungicida	2	2	1	-	+

+: Crescimento fúngico; -: Ausência de crescimento fúngico.

A capacidade de transição morfológica de *Candida* spp. caracteriza-se um dos fatores de virulência mais importante no estabelecimento e progressão da candidíase bucal. Quando leveduriformes fungos do gênero *Candida* habitam comensalmente o trato respiratório, gastrointestinal, vulvovaginal e mucosa bucal de seres humanos sem ocasionar nenhum dano à saúde, entretanto, mudanças fisiológicas ou imunológicas do hospedeiro podem desencadear alterações morfológicas no fungo e este se tornar patogênico [42].

Estudos sobre ação do isoeugenol em alterações morfológicas de *C. tropicalis* ainda são escassos, entretanto pudemos observar que o isoeugenol foi eficiente em inibir a formação de estruturas patogênicas de *C. tropicalis*.

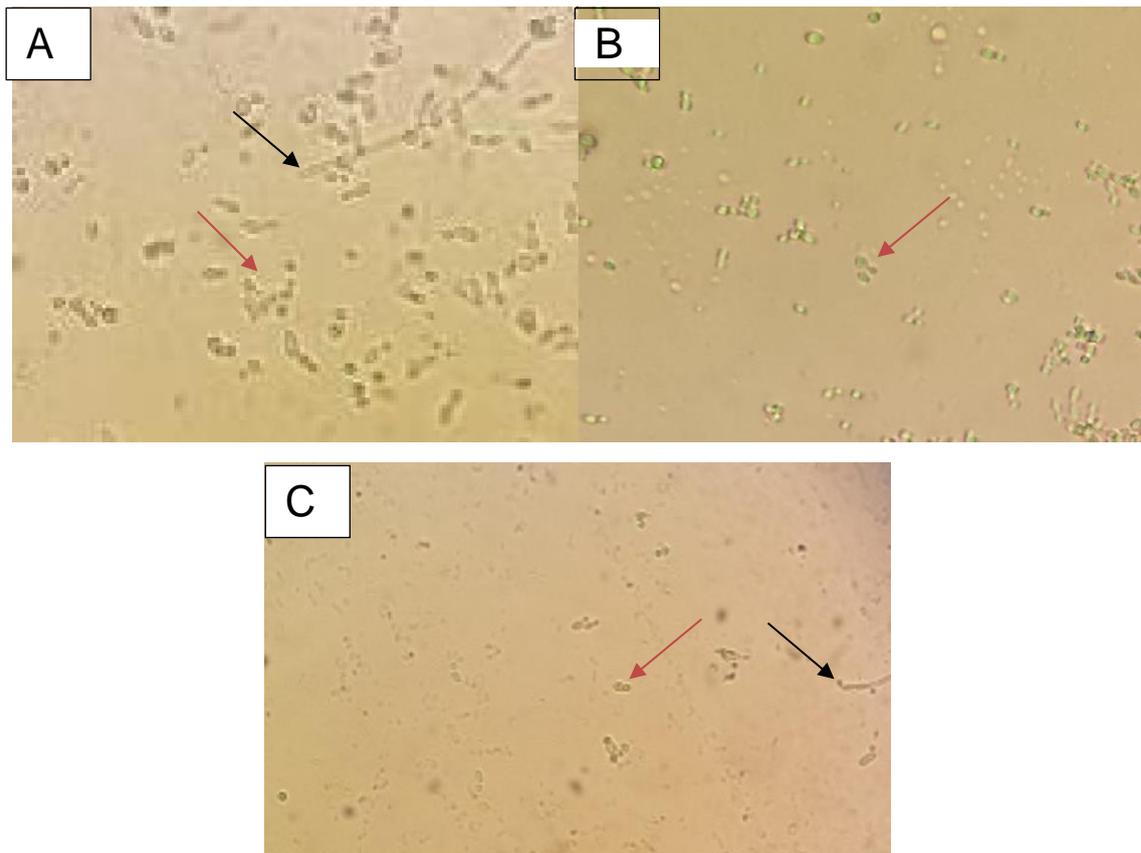


Figura 3: Micromorfologia de *C. tropicalis* na ausência (controle) e presença do isoeugenol e nistatina. (A) Grupo controle LM-211 demonstrando estruturas de crescimento blastoconídios e pseudo-hifas. (B) LM-211 sob influência do isoeugenol na CIM, evidenciando a presença de blastoconídios. (C) LM-211 na presença do antifúngico nistatina. Aumento 400X. Seta preta: indicação de pseudo-hifas. Seta-vermelha: indicação de blastoconídios.

Os resultados do efeito combinatório do isoeugenol e nistatina sobre os isolados clínicos *C. glabrata* LM-118 e *C. tropicalis* LM-211 e os padrões *C. glabrata* ATCC 90030 e *C. tropicalis* ATCC 13803 estão representadas na tabela 3. Foi observado que os isolados padrões *C. glabrata* ATCC 90030 e *C. tropicalis* ATCC 13803 demonstraram indiferença ( $ICIF < 4$ ) no teste de interação do isoeugenol e nistatina pelo método de *checkerboard*, com valores  $ICIF = 3,40$  e  $ICIF = 3,98$ , respectivamente. A combinação nistatina e isoeugenol foi antagônica ( $ICIF \geq 4$ ) em *C. glabrata* LM-116 com valor  $ICIF = 7,98$  e sinérgica em *C. tropicalis* LM-211 com  $ICIF = 0,25$  ( $ICIF \leq 0,5 =$  sinergismo) [38].

Tabela 3: Interação do antifúngico nistatina com isoeugenol sobre *C. glabrata* e *C. tropicalis* pelo método de *checkerboard*.

	<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	<i>C. glabrata</i> LM-116	<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	<i>C. tropicalis</i> LM-211
CIF <sup>a</sup>	0,421	2,65	1,5	0,125
CIF <sup>b</sup>	2,98	5,33	2,484	0,125
ICIF	3,40	7,98	3,98	0,25
Interpretação	Indiferença	Antagonismo	Indiferença	Sinergismo

CIF= Concentração Inibitória Fracionada; ICIF= Índice de Concentração Inibitória Fracionada.

A terapia combinada é uma estratégia laboratorial *in vitro* que visa possibilitar a interação de duas ou mais moléculas em busca do efeito sinérgico para proporcionar alguns benefícios em comparação a monoterapia convencional, como potencializar eficácia terapêutica do fármaco e diminuir o desenvolvimento e evolução de resistências aos antifúngicos [43].

Alguns trabalhos são reportados na literatura por demonstrar o efeito positivo na atividade antifúngica de fármacos convencionais e outros produtos naturais sobre fungos [13,14, 44, 45]. Sobre atividade sinérgica do isoeugenol com antifúngicos convencionais sobre espécies fúngicas, Pinheiro et al. [44], relataram atividade antagônica do isoeugenol em associação a anfotericina b sobre *Cryptococcus neoformans*, entretanto a literatura não reporta nenhum estudo de associação do isoeugenol com nistatina sobre *Candida* spp.

Os mecanismos de ação do isoeugenol envolvidos na atividade antifúngica sobre células fúngicas de *Candida* spp. ainda não foram totalmente elucidados. Galluci et al. [25], observaram que o isoeugenol foi capaz de causar morte celular de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol por perturbar a integridade da membrana celular fúngica. Bhatia et al [39], observaram que o isoeugenol foi capaz de diminuir o pH interno da célula de *Candida* spp., indicando sua ação sobre a bomba de prótons H<sup>+</sup>, e causar ruptura na membrana plasmática fúngica. Peixoto et al. [22] concluíram que a CIM do isoeugenol foi afetada na presença do sorbitol e ergosterol, sugerindo que o

fitocomposto é capaz atuar na biossíntese da parede celular fúngica e alterar a permeabilidade iônica da membrana. Desta forma, uma possível explicação para atividade antagônica dos produtos sobre *C. glabrata* pode estar relacionado a ligação das moléculas no mesmo sítio ativo da membrana plasmática fúngica.

Vale salientar que estudos sobre atividade antifúngica o isoeugenol ainda são escassos na literatura e que nossos achados são os primeiros a relatar atividade combinatória positiva do isoeugenol e nistatina. Nossos resultados demonstraram o isoeugenol tem grande potencial no tratamento de infecções micóticas causadas por *Candida* spp. e de ser um potencial futuro fármaco e por isso novas pesquisas devem ser realizadas para avaliar a atividade antifúngica deste fitocomposto.

#### **4. Conclusão**

O estudo demonstrou que o isoeugenol apresentou efetiva atividade antifúngica sobre isolados de *C. glabrata* e *C. tropicalis*, sendo capaz de inibir o crescimento de estruturas de virulência importantes na progressão da candidíase bucal nas espécies avaliadas. A combinação isoeugenol e nistatina teve efeito antagônico no isolado clínico de *C. glabrata*, sinérgico no isolado clínico de *C. tropicalis* e indiferente nos padrões ATCC de *C. glabrata* e *C. tropicalis*.

Desta forma, o isoeugenol é um fitocomposto com promissora atividade antifúngica no tratamento da candidíase bucal. Estudo futuros devem ser realizados para compreender melhor seu mecanismo de ação, bem como seus efeitos citotóxicos sobre células humanas.

#### **Agradecimentos**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento desta pesquisa. À Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia pelo suporte estrutural.

## Referências

- [1] J.W. Milsop e N. Fazel, "Bucal candidiasis", *Clinics in Dermatology*, vol. 34, n. 4, pp. 487-494, 2016.
- [2] I. Glažar, J. Prpić, M. M. Urek, S. Pezelj-Ribarić, "Identification of *Candida* spp. in the oral cavity in patients with malignant disease", *Vojnosanitetski Pregled*, vol. 74, n. 11, pp.1066-1070, 2017.
- [3] A.A. Oliveira Filho, H.M.B.F. Oliveira, C.I.S. Medeiros et al., "Antifungal effect of 7-hydroxycitronellal against *C. tropicalis* strains: an in vitro approach", *Bioscience Journal*, vol. 33, n. 1, pp. 204-208, 2017.
- [4] A. Akapan, R. Morgan, "Oral candidiasis", *Postgraduate Medical Journal*, vol. 78, n. 922, pp. 455-459, 2002.
- [5] M.A. Pfaller, D.J. Diekema, "Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*", *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 10, n. 1, pp. 11-23, 2004.
- [6] C.A. Kauuffman, J.A. Vazquez, J.D. Sobel, "Prospective multicenter Surveillance study of funguria in hospitalized patients", *Clinical Infectious Diseases*, vol. 30, n. 14, pp.14-18, 2000.
- [7] M.A. Pfaller, D.J. Diekema, D.L. Gibbs et al., "Results from the ARTHEMIS DISK global antifungal surveillance study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion", *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 48, n. 4, pp. 1366-77, 2010.
- [8] S. Vieira, M. Negri, M. Henriques et al., "*Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology and antifungal resistance", *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 36, n. 2, pp. 288-305, 2012.
- [9] J.H. Meurman, E. Siikala, M. Richardson, R. Rautemaa, "Non-*Candida albicans* yeasts of the oral cavity" In: Mendez-Villas A, Editor (s). *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. Formatex Publishing, 2007.
- [10] P. Andreola, A. Demathé, D. Galafassi et al., "Estudo comparativo entre a produção de fosfoliases extracelulares e proteinases do gênero *Candida* isoladas a partir de infecções de cavidade oral", *Revista de Odontologia da UNESP*, vol. 45, n. 4, pp.219-226, 2016.

- [11] W.M. Amin, M.H. Al-Ali, N.A. Salim, S.K. Al-Taraweh, "A new of intraoral delivery of antifungal drugs for the treatment of denture-induced oral candidoses", *European Journal of Dentistry*, vol. 3, n. 4, pp. 257-266, 2009.
- [12] J.A. Skupien, F. Valentini, N. Boscato, T. Pereira-Cenci, "Prevention and treatment of *Candida* colonization on denture liners: A systematic review", *The Journal of Prosthetic Dentistry*, vol. 11, n. 5, pp. 356-362, 2013.
- [13] C.H.W. Hirata, "Oral manifestations in AIDS", *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, vol. 81, n. 2, pp. 102-123, 2015.
- [14] D.F.B. Manguiera, L.F.B. Manguiera, M.F.F.M. Diniz, "Candidose oral", *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*, vol. 14, n. 2, pp. 69-72, 2010.
- [15] J.V. Peixoto, M.G. Rocha, R.T.L. Nascimento, V.V. Moreira, T.G.B. Kashiwabara, "Candidíase – Uma revisão de literatura", *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Reserch*, vol. 8, n. 2, pp. 75-82, 2014.
- [16] M.S.A. Khan, A. Malik, I. Ahmad, "Anti-candidal activity of essential oils alone and in combination with amphotericin B or fluconazole against multi-drug resistant isolates of *Candida albicans*", *Medical Mycology*, vol. 50, n. 1, pp. 33-42, 2012.
- [17] R.D. Castro, T.M.P.A. Souza, L.M.B. Bezerra et al., "Antifungal activity and mode of action of thymol and its synergism with nystatin against *Candida* species involved with infections in the oral cavity: an *in vitro* study", *BMC Complementary & Alternative Medicine*, vol. 15, n. 417, artigo ID: PMC 4659158, 2015.
- [18] H. M. Capristano, E.M. De-Assis, R.M. Leal et al., "Brazilian green propolis compared to miconazole gel in the treatment of *Candida*-associated denture stomatitis", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2013, artigo ID 947980, 2013.
- [19] J.C. Freire, J.K.O. Júnior, D.F. Silva et al., "Antifungal Activity of Essential Oils against *Candida albicans* Strains Isolated from Users of Dental Prostheses", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2017, artigo ID 7158756, 2017.
- [20] S.B. Paula, T.F. Bartelli, V. Di-Raimo et al., "Effect of Eugenol on Cell Surface Hydrophobicity, Adhesion, and Biofilm of *Candida tropicalis* and *Candida dubliniensis* Isolated from Oral Cavity of HIV-Infected Patients", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2014, artigo ID 505204, 2014.
- [21] R.S. Afonso, G.B.C.A. Slana, T.C.C. França., "Aspectos químicos e biológicos do óleo essencial de cravo da Índia", *Revista Virtual de Química*, vol. 4, n. 2, pp. 146-161, 2012.

- [22] L.R. Peixoto, P.L. Rosalen, G.L.S. Freires et al., "Antifungal activity, mode of action and anti-biofilm effects of *Laurus nobilis* Linnaeus essential oil against *Candida* spp.", Archives of Oral Biology, vol. 73, pp. 179-185, 2017.
- [23] M. Jukić, O. Politeo, M. Milos, "Chemical Composition and antioxidant effect of free volatile aglycones from nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.) compared to its essential oil.", Croatia Chemica Acta, vol. 79, n. 2, pp. 209-214, 2006.
- [24] A. Zallara, N. Kourkoumelis, T.P. Stanoikovic, D. Kovala-Demertzi, "Cytotoxic activity of essential oil and extracts of *Ocimum basilicum* against human carcinoma cells. molecular docking study of isoeugenol as a potent cox and lox inhibitor", Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, vol. 9, n. 3, pp. 907-917, 2014.
- [25] M.N. Gallucci, M.E. Carezzano, M.M. Oliva et al., "In vitro activity of natural phenolic compounds against fluconazole-resistant *Candida* species: a quantitative structure–activity relationship analysis.", Journal of Applied Microbiology, vol. 116, n. 4, pp. 795-804, 2014.
- [26] A. Kiessling, D. Johansson, I.H. Zahl, O.B. Samuelsen. "Pharmacokinetics, plasma cortisol and effectiveness of benzocaine, MS-222 and isoeugenol measured in individual dorsal aorta-cannulated Atlantic salmon (*Salmo salar*)", Aquaculture, vol. 286, n. 3, pp. 301-308, 2009.
- [27] E. W. Konemam, W. C. Winn, S. D. Allen et al., "Diagnóstico Microbiológico", MEDS, Rio de Janeiro, Brazil, 5ª edição, 2001.
- [28] Clinical and Laboratory Standards Institute, Protocol M27-A2. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, NCCLS, Wayne, Pa, USA, 2ª edição, 2002.
- [29] E.A. Ostrosky, M.K. Mizumoto, M.E.L. Lima et al., "Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais", Revista Brasileira de Farmacognosia, vol. 18, n. 2, pp. 301-307, 2008.
- [30] R. Cleeland and E. Squires, "Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections," in Antibiotics in Laboratory Medicine, V. M. D. Lorian, Ed., pp. 739–788, Williams&Wilkins, 1991.
- [31] A. Alberkume, M. Cuenca-Estrella, A. Gomez-Lopez et al, "Comparative evaluation of two difference methods of inoculum preparation for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi", Journal of Antimicrobial Chemotherapy, vol. 50, pp. 719-722, 2002.
- [32] F. Hadacek and H. Greger, "Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice", Phytochemical Analysis, vol.11, n.3, pp.137–147, 2000.

- [33] N.S. Ncube, A.J. Afolayan, A.I. Okoh, "Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plants origin: current methods and future trends, African Journal of Biotechnology, vol. 7, n. 12, pp. 1797-1806, 2008.
- [34] M. Balouiri, M. Sadiki, S.K. Ibensouda, "Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review", Journal Pharmaceuticals Analysis, vol. 6, n. 2, pp. 71-79, 2016.
- [35] G. Morales, A. Paredes, P. Sierra, L.A. Loyola. "Antimicrobial activity of three baccharis species used in the traditional medicine of Northern Chile", Molecules, vol. 13, n. 4, pp. 790-794, 2008.
- [36] Z. N. Siddique, F. Farooq, T. N. M. Musthafa, A. Ahmad, and A.U.Khan, "Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives", Journal of Saudi Chemical Society, vol. 17, n. 2, pp. 237–243, 2013.
- [37] N.K. Dutta, S.G. Kumar, K. Mazumbar et al., "Antimycobacterial activity of the antiinflammatory agent diclofenac sodium, and its synergism with streptomycin", Brazilian Journal of Microbiology, vol. 35, n. 1, pp. 316-323, 2004.
- [38] R.E. Lewis, D.J. Diekema, S.A. Messer, M.A. Pfaler, M.E. Klepser, "Comparison of Etest, chequerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species", Journal Antimicrobial Chemother, vol. 49, n. 2, pp. 345- 351, 2002.
- [39] R. Bhatia, S. Shreaz, N. Khan, S. Muralidhar et al., "Proton pumping ATPase mediated fungicidal activity of two essential oil components", Journal of Basic Microbiology, vol. 52, n.5, pp. 504-512, 2012.
- [40] J.S. Dambolena, A.G. López, J.M. Meriles, H.R. Rubinstein, J.A. Zygodlo., "Inhibitory effect 10 natural phenolic compounds on *Fusarium verticillioides*. A structure-property-activity relationship study", Food Control, vol. 28, pp. 163-170, 2012.
- [41] R.P. Pizzolitto, C.L. Barberis, J. S. Dambolema et al., "Inhibitory effect of natural phenolic compounds on *Aspergillus parasiticus* growth", Journal of Chemistry, vol. 2015, Artigo ID 547925, 2015.
- [42] L.S.Barbedo, D.B.G. Sgradi "Candidíase", Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis, vol. 22, n. 1, pp. 22-38, 2010.
- [43] I. Gadea, J. Mensa "Pontential de anidulafungina em la terapia combinada" Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, vol. 26, n. 14, pp. 51-55, 2008.
- [44] L.S. Pinheiro, J.P. Sousa, N.A. Barreto et al., "Eugenol and Isoeugenol in association with antifungal against *Cryptococcus neoformans*", International Journal of Pharmacology and Phytochemical Research, vol. 9, n. 4, pp. 596-599, 2017.

[45] E.A. Abourashed, A.M. Galal, A.M. Shebel, J.S. Mossa, "Enhancing effect of isoeugenol on the antimicrobial activity of isoniazid, 6-paraol and 6-shogaol", *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*, vol. 13, n.4, pp. 95-103, 2006.

### 3. CAPÍTULO 2

O manuscrito a seguir será submetido para publicação no periódico “**Current Topics in Medicinal Chemistry**”, ISSN: 1568-0266/ Qualis Capes Odontologia A2.

# Atividade antifúngica e estudo de docking molecular do isoeugenol e acetamidas híbridos sobre *Candida albicans* isolado da cavidade oral.

Daianne de Sousa Medeiros<sup>a\*</sup>, José Klidenberg de Oliveira Júnior<sup>a</sup>, Jeferson Rodrigues Nóbrega<sup>a</sup>, Jeane Uilma Galindo Jardim<sup>b</sup>, Helivaldo Diogenes da Silva Souza<sup>b</sup>, Gracielle Angeline Tavares da Silva<sup>b</sup>, Petrônio Filgueiras de Athayde Filho<sup>b</sup>, José Maria Barbosa Filho<sup>b</sup>, Luciana Scotti<sup>c</sup>, Edeltrudes de Oliveira Lima<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Pesquisa: Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, Brasil.

<sup>b</sup> Laboratório de Pesquisa em Bioenergética e Síntese Orgânica, Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, Brasil.

<sup>c</sup> Laboratório de Quimioinformática, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, Brasil.

**Resumo:** O objetivo deste estudo foi avaliar atividade antifúngica do isoeugenol e novas moléculas sintéticas sobre *C. albicans*, utilizando como metodologia a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Fungicida Mínima (CFM), análise da ação do isoeugenol sobre a micromorfologia, teste de interação com nistatina pelo método de *checkerboard* e estudo de acoplamento molecular com enzimas importantes na manutenção da viabilidade fúngica. As moléculas sintéticas não demonstraram nenhuma atividade antifúngica *in vitro*. Os valores da CIM<sub>50%</sub> do isoeugenol variaram entre 128 µg/mL e 256 µg/mL. A CFM do isoeugenol apresentou valores idênticos as suas respectivas CIM's. O estudo da ação do isoeugenol sobre a micromorfologia demonstrou que o fitocomposto foi eficaz em inibir a formação de estruturas de resistência. O teste de interação entre o isoeugenol e nistatina demonstrou como resultado indiferença. Os resultados de acoplamento molecular indicaram melhor interação do isoeugenol com a enzima delta-14-esterol redutase, seguido da 14- $\alpha$ -desmetilase, com valores de energia -84.5773 e -69.4023 respectivamente. Os resultados deste estudo permitem concluir que o isoeugenol possui efetiva atividade antifúngica, e que seus possíveis alvos moleculares são a síntese da parede celular fúngica e a membrana plasmática fúngica.

**Palavras-chave:** *Candida albicans*, Isoeugenol, Método checkerboard, Docking molecular, Atividade Antifúngica, Candidíase oral.

## 1. INTRODUÇÃO

A candidíase é processo infeccioso de importância clínica ocasionado por fungos dimórficos, comensais, oportunistas, pertencentes ao gênero *Candida* [1]. É uma patologia de grande relevância pública, uma vez que, leveduras desse gênero são responsáveis por cerca de 80% das infecções fúngicas hospitalares [2], representando o quarto patógeno nosocomial mais comum em infecções sistêmicas [3], com taxas de morbimortalidade entre 30-50% [4].

*Candida* compreende cerca de 150-200 espécies descritas, no entanto apenas quinze são patogênicas ao homem, sendo *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* as mais prevalentes em diferentes tipos de candidíases [5-7]. Diversos fatores de virulências estão diretamente relacionados a capacidade de infecção dessas espécies aos seus hospedeiros, dentre elas a aptidão a transição morfológica entre os estados leveduriforme e hifal, plasticidade fenotípica, formação de biofilmes, produção e secreção de enzimas hidrolíticas tais como fosfatases, lipases e hemolisinas, expressão de adesinas e invasinas e crescimento via tigmotropismo [8, 9].

Entre as infecções fúngicas de mucosas, a candidíase oral encontra-se entre a mais prevalente, apresentando como quadro clínico o surgimento de placas amarelo-esbranquiçada ou nódulos avermelhados, de aspecto diversos, encontrados aderidos a mucosa bucal, língua, palato e gengivas [10]. Diversos fatores predisponentes estão associados a alta prevalência da candidíase oral, entre eles o uso noturno de próteses dentárias, diminuição do pH salivar, xerostomia, uso prolongado de antibioticoterapia e drogas imunossupressoras, deficiência nutricional, distúrbios endócrinos e aumento da expectativa de vida da população [6, 11, 12].

O tratamento da candidíase baseia-se na utilização de agentes antifúngicos das classes dos azóis (fluconazol, miconazol, cetoconazol, itraconazol), polienos (nistatina e anfotericina B), equinocardinas (caspofungina, micafungina e anidulafungina) e antimetabólitos (flucitocina) [11-13]. Entretanto, com o aumento da resistência fúngica aos agentes antimicrobianos e o número limitado de moléculas antifúngicas disponíveis no mercado é crescente a busca por novos

compostos bioativos capazes de inibir o crescimento de *Candida* e demonstrar baixa toxicidade a células humanas [14,15].

As plantas medicinais representam uma fonte inesgotável de novas moléculas farmacologicamente ativas ao tratamento de doenças fúngicas [15-17]. Entre os compostos isolados de plantas, os fenilpropanóides constituem um grupo de fitocompostos derivados da fenilalanina amplamente encontrados nos óleos essenciais de *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia), *Myristica fragrans* (noz mostrada), *Ocimum basilicum* L (manjeriço), *Laurus nobilis* (louro) [15,18-20].

São sintetizados a partir da desaminação da L-fenilalanina à ácido transcinâmico, via ácido chiquímico, com posterior redução a aldeídos e outras reações dependentes de enzimas [21,22]. Apresentada sua estrutura química formada por um esqueleto carbônico composto por três átomos de carbonos ligados a um anel aromático fenil, sendo o isoeugenol um representante dessa classe de moléculas [23].

Numerosas publicações relatam propriedades antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral e analgésica dos fenilpropanóides [15,19,24,25]. Entretanto, ainda há poucos trabalhos publicados sobre a atividade antifúngica desse fitocomposto sobre *Candida* spp., demonstrando necessidade de maiores estudos para compreensão desta propriedade sobre cepas desse gênero.

Nesta perspectiva, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antifúngica do isoeugenol e acetamidas híbridos frente a *Candida albicans* isoladas da cavidade oral, bem como investigar seu efeito sobre estruturas de patogenicidade dessa espécie e realizar estudo de ancoragem molecular com enzimas importantes às células fúngicas.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Local da pesquisa**

Os ensaios microbiológicos foram realizados no Laboratório de Pesquisa: Atividade antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (DF/CCS/ UFPB).

## 2.2 Produtos testes

As substâncias isoeugenol (Sigma aldrich<sup>®</sup>, São Paulo, SP, Brasil), nistatina (Fragon<sup>®</sup>, São Paulo, SP, Brasil), dimetilsulfóxido (DMSO) (Labsynth produtos para laboratórios. Ltd., Diadema, SP, Brasil) e Tween-80 (Vetec Fine Chemicals Ltd., Duque de Caxias, RJ, Brasil), utilizados nesta pesquisa, foram obtidas comercialmente. Os compostos sintéticos derivados do isoeugenol (figura 1) foram sintetizados no Laboratório de Pesquisa em Bioenergia e Síntese Orgânica (DQ/CCEN/UFPB) e cedidos para realização deste estudo.

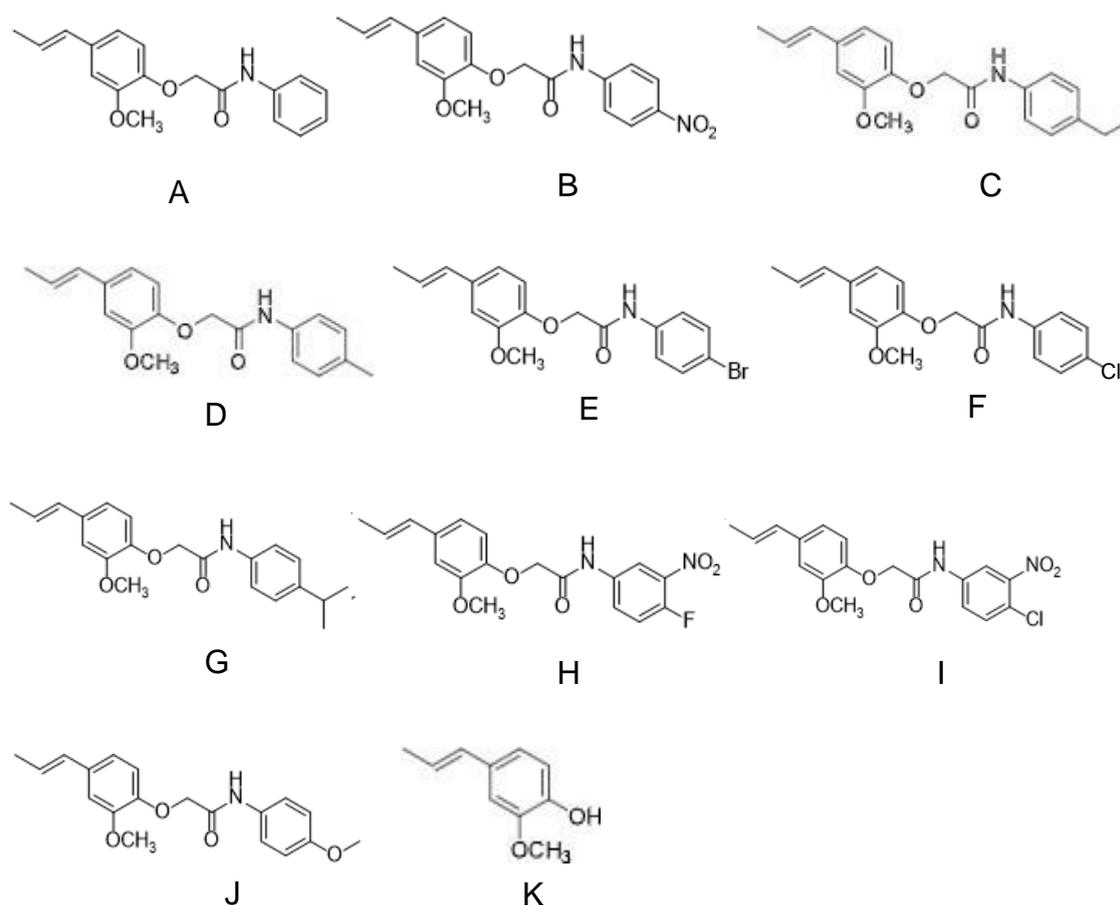


Figura 1: Estrutura química das substâncias acetaminas derivadas do isoeugenol. A: ISO A1; B: ISO A2; C: ISO A3; D: ISO A4; E: ISO A5; F: ISO A6; G: ISO A7; H: ISO A8; I: A10; J: ISO A11; K: isoeugenol

### **2.3 Micro-organismos**

Os isolados utilizados neste estudo pertenciam a coleção de micologia do Laboratório de Pesquisa: Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (DF/CCS/ UFPB). Foram utilizadas ao total cinco cepas fúngicas de *C. albicans* isoladas da cavidade oral, sendo quatro isolados clínicos (LM-4b, LM-5b, LM-10b, LM-11b, LM-13b) e um padrão ATCC-76485. Todas as cepas foram conservadas em Ágar Sabouraud Dextrose (ASD - Difco®, USA, França) a 4 °C e a 35 °C (± 2°C) por 24h para preparação dos inóculos e realização dos testes *in vitro*.

### **2.4 Triagem microbiológica e Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

A triagem microbiológica e a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos produtos avaliados foram determinados pelo método de microdiluição em caldo utilizando placas de fundo redondo com 96 poços (Kasvi®, Itália) [26-28].

Inicialmente, 100 µL de caldo RPMI-1640 (Sigma-Aldrich®/São Paulo/Brasil) duplamente concentrado foi adicionado aos poços da placa. Em seguida, 100 µL dos produtos testes foram inseridos na primeira linha da placa e realizado diluição em série, transferindo uma alíquota de 100 µL do poço contendo meio mais concentrado para o poço subsequente (menos concentrado), até chegar as concentrações de 1024 a 128 µg/mL na triagem e de 1024 a 4 µg/mL na CIM. Por último, 10 µL do inóculo correspondente a cada levedura foi adicionado aos poços.

Os inóculos foram preparados em 5 mL de solução salina estéril a 0,9% (Farmax, Amaral, Divinópolis, MG, Brasil) e agitados em vórtex (Fanem Ltda., Guarulhos, SP, Brasil) por 15 segundos. A densidade celular foi comparada e padronizada, utilizando sulfato de bário a 0,5 da escala de McFaland que corresponde a 10<sup>6</sup> Unidades Formadoras de Colônia por milímetro (UFC/mL). A obtenção do inóculo a concentração 10<sup>5</sup> UFC/mL, foi realizada por diluição a proporção 1:10 e a concentração final do inóculo (1-5 1-5 X 10<sup>5</sup> UFC/mL) confirmada em câmara de Neubauer [26, 29,30]. Os controles de esterilidade do

meio, viabilidade das cepas e susceptibilidade ao antifúngico padrão nistatina 100 UI foram realizados em paralelo ao teste antifúngico e às condições do ensaio.

O ensaio foi realizado em duplicata e as placas de microdiluição foram incubadas a 35° C ( $\pm 2$  °C) por 24 a 48 horas para posterior análise visual da formação ou não de aglomerado de células no fundo dos poços. Foi considerado como CIM, a menor concentração dos produtos testes capazes de inibir visualmente o crescimento fúngico dos inóculos em comparação aos controles.

Para interpretação da atividade antimicrobiana dos produtos testes foi determinado os seguintes valores padrão para CIM: <100 µg/mL (atividade boa/forte); 100 - 500 µg/mL (atividade moderada); 500 – 1000 µg/mL (atividade fraca) e CIM > 1000 µg/mL (inatividade) [31].

## **2.5 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)**

Após a determinação da CIM, alíquotas de 10 µL do sobrenadante dos poços equivalente a CIM, CIM X2 e CIM X4 foram repassadas para placa de 96 poços contendo meio de cultura RPMI 1640 (Difco®, USA, França) e incubada a 35 °C ( $\pm 2$  °C) por 24 -48h. A leitura da placa foi realizada visualmente e CFM determinada como a menor concentração dos produtos capaz de inibir o crescimento fúngico. Os ensaios foram realizados em duplicata e os valores expressos em média aritmética. A relação CFM/CIM foi calculada para determinar ação fungicida (CFM/CIM <4) ou fungistática (CFM/CIM  $\geq 4$ ) dos produtos [32].

## **2.6 Ação dos produtos testes sobre a micromorfologia de *C. albicans***

Para avaliar as possíveis alterações na micromorfologia de células de *C. albicans* expostas ao isoeugenol realizou-se microcultivo em câmara úmida utilizando meio Ágar-Fubá-Tween 80 sólido [16]. Alíquotas de 3mL de Agar-Fubá-Tween 80 líquido, homogeneizados a CIM, CIM X2 e CIM X4 dos produtos teste, foram despejadas em lâmina de vidro e *C. albicans* foram semeadas e incubadas por 35 °C  $\pm 2$ °C durante 24-48 horas.

As lâminas foram analisadas em microscopia óptica, em aumento de 400x, para observar a formação, ou não, de estruturas características como

clamidoconídios, blastoconídios e pseudo-hifas. A contagem das estruturas formadas foi realizada e posteriormente fotodocumentadas.

## **2.7 Estudo de associação *in vitro***

O teste de susceptibilidade de *C. albicans* na combinação do isoeugenol e nistatina (100 UI) foi determinado por microdiluição em caldo pela técnica de *checkerboard*.

Para realização deste ensaio, inicialmente foi adicionado 100 µL de Caldo Sabouraud Dextrose, nos poços da placa de 96 poços de fundo redondo (Kasvi®/Itália). Em seguida, 50 µL do isoeugenol nas concentrações CIM÷8; CIM÷4, CIM÷2, CIM, CIMx2, CIMx4 e CIMx8 foram adicionadas verticalmente e 50 µL da nistatina nessas mesmas concentrações foram adicionadas horizontalmente. Por fim, foi adicionado 10 µL do inóculo fúngico *C. albicans* LM-4b e ATCC 76485 aos poços e as placas tampadas e incubadas a 35 °C ± 2 °C por 72 h. [33,34] Controles de esterilidade do meio e viabilidade das cepas foram realizados. A leitura dos resultados foi realizada visualmente e o Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) foi determinado.

O cálculo do índice CIF foi realizado pelo somatório do CIF<sup>A</sup> + CIF<sup>B</sup>, em que A é o isoeugenol e B é a nistatina; e o CIF<sup>A</sup>, por sua vez, foi determinado pela divisão da CIM<sup>A</sup> combinado/CIM<sup>A</sup> sozinho e o CIF<sup>B</sup> determinado pela divisão da CIM<sup>B</sup> combinado/ CIM<sup>B</sup> sozinho. Os resultados foram interpretados da seguinte maneira: sinergismo (ICIF ≤ 0,5), indiferença (0,5 ≥ ICIF < 4) e antagonismo (ICIF ≥ 4) [33,34].

## **2.8 Docking molecular**

As estruturas tridimensionais das moléculas híbridas e do isoeugenol foram desenhadas utilizando software MarvinSkentch 18.5 e as suas energias minimizadas no software Spartan 18'. A estrutura cristalizada das proteínas esterol 14-α-desmetilase, delta-14-esterol redutase, 1,3-glucan-sintase e timidilato sintetase foram baixadas no Protein Data Bank (PDB) ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)), sob PDB ID's 5FSA [35], 4QUV [36], 2J0Y [37] e 3QJ7 [38] respectivamente. Os cálculos de ancoragem molecular foram determinados utilizando software Malegro virtual Docker, v. 6.0.1., em que o ligante e os receptores foram submetidos a ancoragem

molecular sob GRID 15 Å em raio e 0.30 Å de resolução ao sítio de ligação da enzima.

## 2.9 Análises dos dados

As análises estatísticas da CIM, CFM e estudo da associação foram determinados por estatística inferencial e descritiva. A análise dos dados da ação do isoeugenol sobre a micromorfologia das cepas fúngicas foram determinadas com o auxílio do software GrafPad Prism v. 7.05 (GraphPad for Windows, San Diego, CA – USA) e os resultados gerado em média e desvio padrão.

## 3. RESULTADOS

### 3.1 Determinação da CIM e CFM

Os valores da CIM e da CFM do isoeugenol e nistatina contra *Candida albicans* são mostrados na tabela 1. As moléculas híbridas do isoeugenol não demonstraram atividade antifúngica sobre os isolados de *C. albicans* (CIM = 1024 µg/mL).

Os valores da CIM<sub>50%</sub> e CFM<sub>50%</sub> do isoeugenol variaram entre 128 µg/mL e 256 µg/mL. Para a nistatina, os valores da CIM<sub>100%</sub> foi de 8 µg/mL, enquanto que a CFM<sub>50%</sub> variou entre 8 µg/mL e 32 µg/mL.

O controle de viabilidade das cepas apresentou crescimento fúngico em todos os poços e o de esterilidade do meio nenhum crescimento fúngico.

Tabela 1: Resultados da atividade antifúngica do isoeugenol e nistatina sobre *C. albicans*.

C. <i>albicans</i>	Isoeugenol (g/mL)			Nistatina (g/mL)			Controle	
	CIM	CFM	CFM/CIM*	CIM	CFM	CFM/CIM*	meio de cultura	viabilidade fúngica
LM-4b	128	128	1	8	8	1	-	+
LM-5b	128	128	1	8	8	1	-	+
LM-10b	128	128	1	8	8	1	-	+
LM-11b	256	256	1	8	32	4	-	+
LM-13b	256	256	1	8	32	4	-	+

ATCC	256	256	1	8	32	4	-	+
76485								

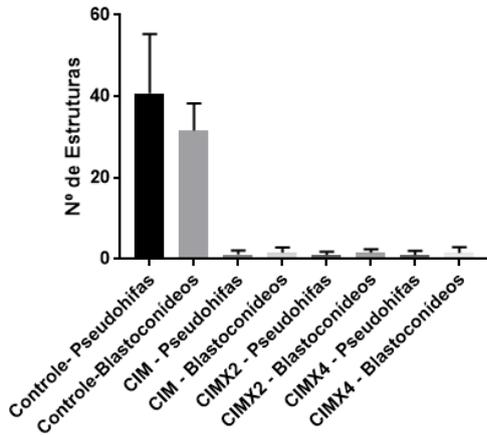
---

(-) ausência de crescimento fúngico (+) presença de crescimento fúngico

### **3.2 Interferência do isoeugenol sobre a micromorfologia de *C. albicans***

O teste das possíveis interferências do isoeugenol sobre a micromorfologia de *C. albicans* ATCC 13803 e LM-4b foi realizado com o objetivo de verificar o crescimento ou não de estruturas características, blastoconídios, clamidoconídios e pseudo-hifas, às concentrações da CIM, CIMX2, CIMX4 e ausência do isoeugenol. Os números das estruturas de virulência, blastoconídios e pseudo-hifas, foram realizados através da média das contagens de estruturas por campo, em cinco campos analisados das lâminas (Figura 2 e Figura 3). As estruturas de resistência clamidoconídios não foram encontradas nas concentrações da CIM, CIMX2 e CIMX4 do produto (Figura 4).

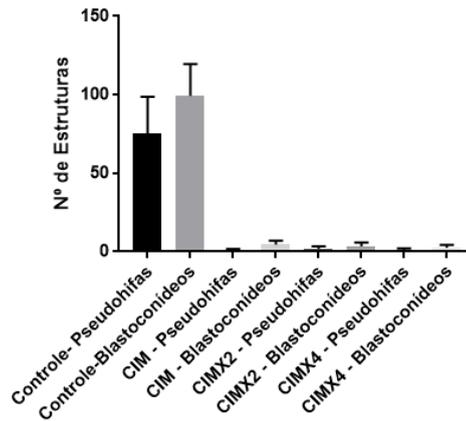
**Micromorfologia - *C. albicans* ATCC76485**



Concentração Isoeugenol - Estrutura de virulência

Figura 2: Crescimento de pseudo-hifas e blastoconídios do isolado ATCC 76485 na presença do isoeugenol (CIM, CIMX2 e CIMX4) e na ausência do fitoconstituente (controle).

**Micromorfologia - *C. albicans* LM-4B**



Concentração Isoeugenol - Estrutura de virulência

Figura 3: Crescimento de pseudo-hifas e blastoconídios do isolado LM-4b na presença do isoeugenol (CIM, CIMX2 e CIMX4) e na ausência do fitoconstituente (controle).

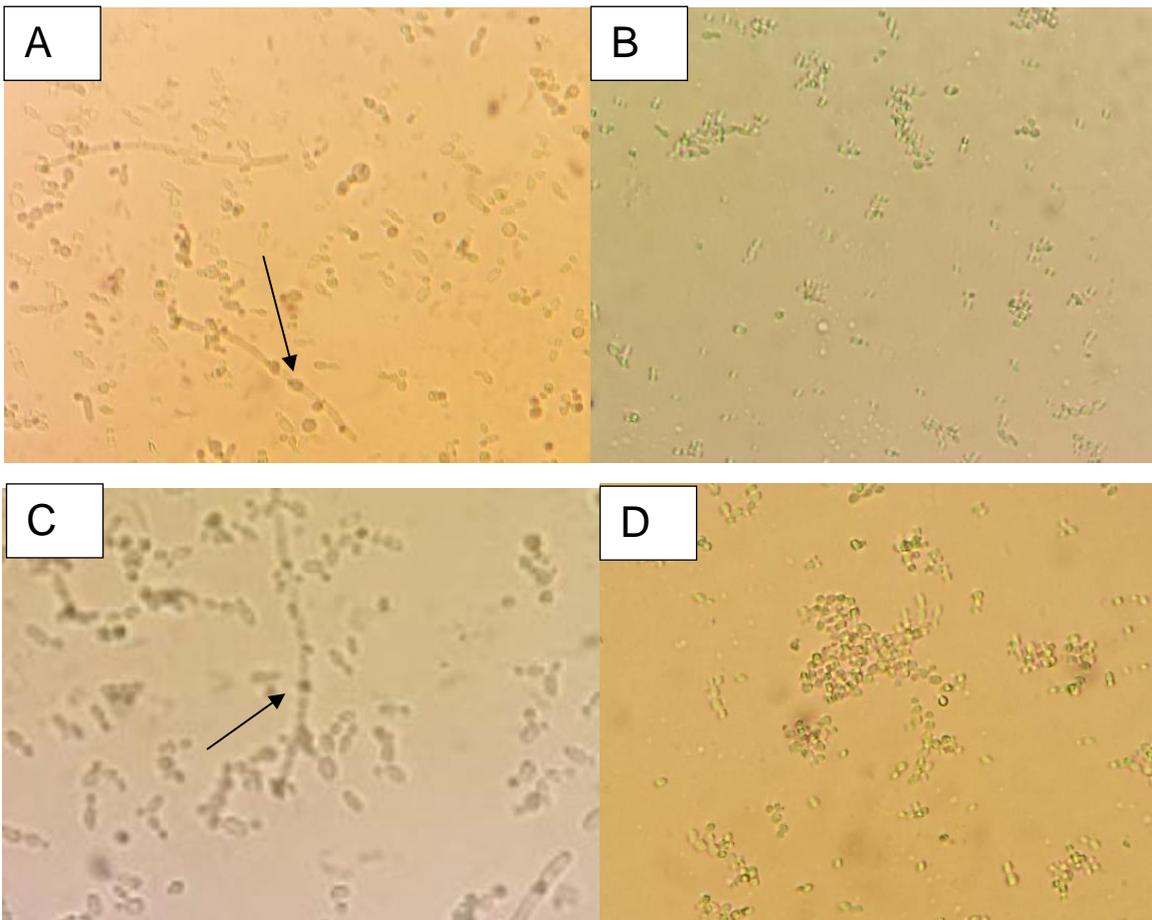


Figura 4: Micromorfologia em microscopia óptica comum (aumento 400x) na ausência e presença do isoeugenol. A) *C. albicans* ATCC 76485 na ausência do

isoeugenol (controle), evidenciando estruturas de virulência pseudo-hifas e blastoconídios B) *C. albicans* ATCC 76485 na presença do isoeugenol, exibindo ausência de pseudo-hifas e número reduzido de blastoconídios. C) *C. albicans* LM-4b na ausência do isoeugenol, demonstrando grande quantidade de blastoconídios e pseudo-hifas. D) *C. albicans* LM-4b sob efeito do isoeugenol exibindo ausência de blastoconídios. Seta preta: Estruturas de resistência clamidoconídios.

### 3.3 Teste de sinergismo

Os resultados da interação do isoeugenol e nistatina foram avaliados segundo a metodologia de *checkerboard*. O método de *checkerboard* é uma técnica laboratorial *in vitro* que possibilita a interação de duas ou mais moléculas por meio da construção de uma matriz bidimensional entre as substâncias testes [34] Os dados obtidos neste estudo demonstraram que a interação do isoeugenol com a nistatina foi do tipo indiferente com valores do índice CIF=2,10 e CIF=3,09, para *C. albicans* ATCC 76485 e *C. albicans* LM-4b, respectivamente.

Tabela 2: Teste de modulação entre isoeugenol e nistatina sobre *C. albicans* ATCC 76485 e LM-4b.

Isolados fúngicos	CIM (µg/mL)		Concentração Inibitória Fracionada (CIF)		Índice CIF	Tipo de interação
	Isoeugenol	Nistatina	CIF <sup>a</sup>	CIF <sup>b</sup>		
<i>C. albicans</i> ATCC 76485	256	8	0,98	1,12	2,10	Indiferença
<i>C. albicans</i> LM-4b	128	8	1,10	1,98	3,09	Indiferença

### 3.4 Docking molecular

O estudo de docking molecular revelou que a molécula ISO A2, derivada do isoeugenol, e o próprio isoeugenol se encaixaram no sítio ativo das enzimas 14- $\alpha$ -desmetilase (PDB id: 5FSA) [35], delta-14-esterol redutase (PDB id: 4QUV) [36], lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilase (PDB id: 2J0Y) [37] e  $\beta$ -1,3-D-glucano (PDB id: 3QJ7) [38] responsáveis pela biossíntese e manutenção da membrana plasmática fúngica

e formação da parede celular. As energias de ligação entre as moléculas e a proteína alvo (MolDock score) estão representadas na tabela 3.

Tabela 3: Energias de ligação isoeugenol e molécula híbrida ISO A2 com enzimas fúngicas selecionadas. Os valores estão expressos em kcal/mol.

Enzimas fúngicas	Compostos	
	Isoeugenol	ISO A2
14- $\alpha$ -desmetilase	-69.4023	-112.52
Delta 14- esterol redutase	-84.5773	-119.122
Lanosterol 14- $\alpha$ - desmetilase	-34.0519	-53.8423
$\beta$ -1,3 glucano	-53.8295	-92.1744

A figura 5 A-D mostra os resultados do estudo do docking do isoeugenol com as enzimas avaliadas. A Delta-14- esterol redutase foi a enzima com melhor valor de energia em acoplamento com isoeugenol (-84,5773 kcal/mol), demonstrando ligações de hidrogênio do grupo metóxi e hidroxila livre com Leu347 e ligação estérica com o resíduo Tyr414 (figura 5B). A 14- $\alpha$ -desmetilase foi a segunda enzima a demonstrar melhor valor de energia (-69.4023 kcal/mol) apresentando ligações de hidrogênio do oxigênio da hidroxila com resíduo Ser378 e eletrostática do oxigênio do grupo metóxi com o resíduo Met508 (Figura 5A).

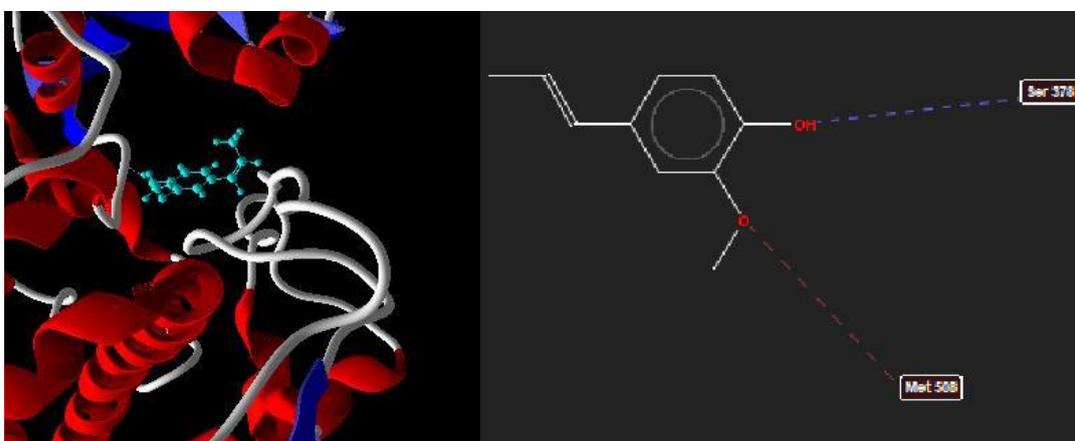


Figura 5 A: Interações observadas entre isoeugenol e 14- $\alpha$ -desmetilase. Linhas tracejadas azuis indicam ligações de hidrogênio. Linhas tracejadas vermelhas indicam ligações eletrostáticas.

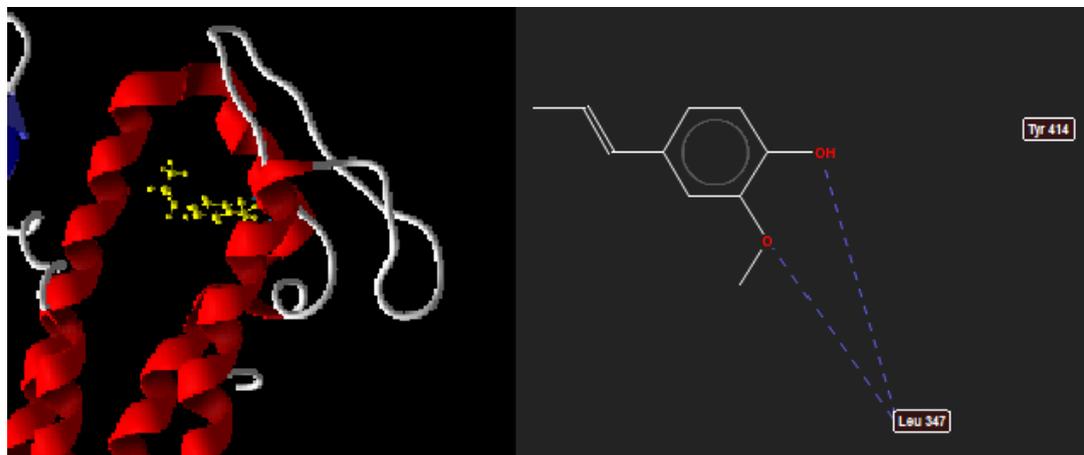


Figura 5 B: Interações observadas entre isoeugenol e Delta-14- $\alpha$ -redutase. Linhas tracejadas azuis indicam ligações de hidrogênio.

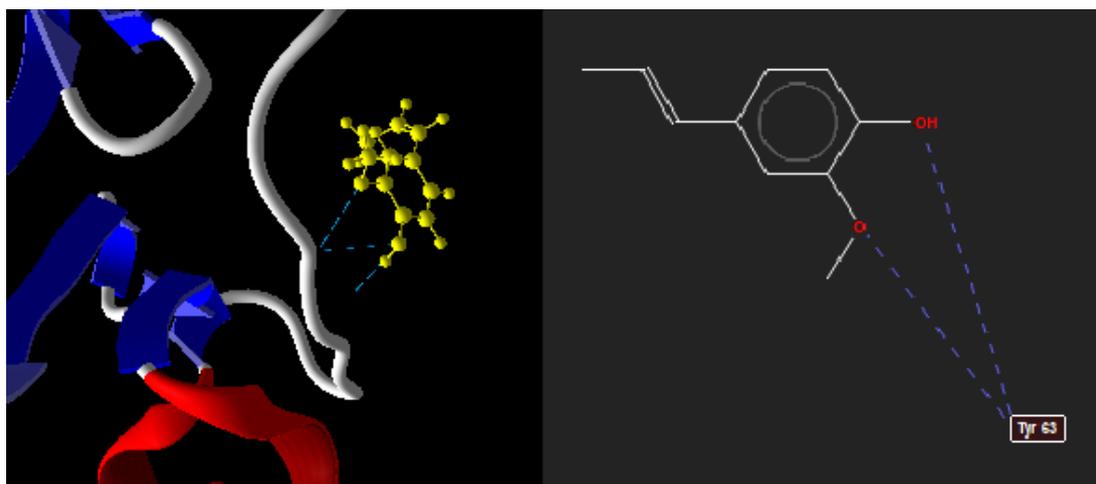


Figura 5 C: Interações observadas entre isoeugenol e Lanosterol-14- $\alpha$ -desmetilase. Linhas tracejadas azuis indicam ligações de hidrogênio.

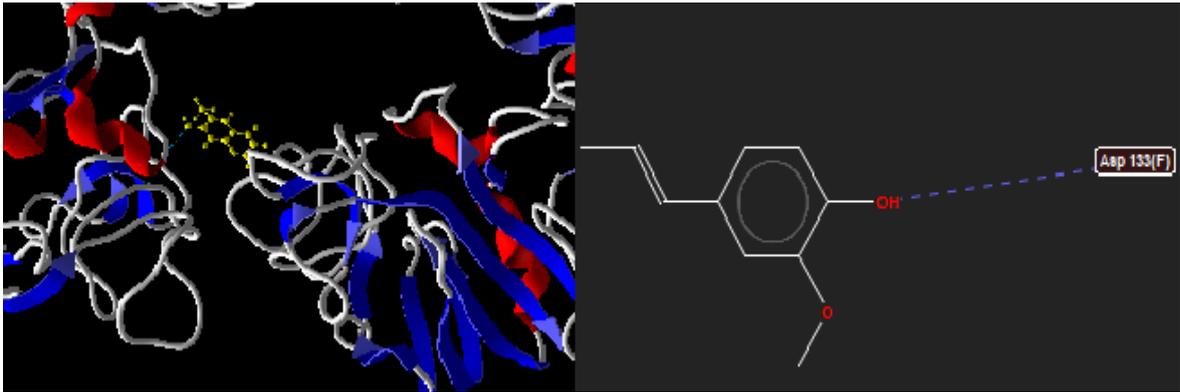


Figura 5 D – Interações observadas entre isoeugenol e  $\beta$ -1,3 glucano. Linhas tracejadas azuis indicam ligações de hidrogênio.

A figura 6 A-D mostra os resultados do estudo do docking da molécula sintética ISO A2 com as enzimas fúngicas avaliadas. A enzima que apresentou melhor valor de energia foi  $\beta$ -1,3 glucano (-92.1744 kcal/mol), seguido da lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilase (-53.8423 kcal/mol). As interações observadas entre a molécula ISO A2 e enzima  $\beta$ -1,3 glucano foram ligações de hidrogênio e eletrostáticas entre resíduos Phe262 (B) e Asn264 (B) com grupo dióxido de nitrogênio; ligação de hidrogênio entre o oxigênio do grupo acetamida e o resíduo Thr136(F), de hidrogênio e eletrostática com Asp133(F) e eletrostática do anel benzênico com os resíduos Lys221 (F) e Tyr131 (F) (Figura 6D).

Para enzima lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilase as interações observadas foram ligações de hidrogênio do resíduo Tyr63 com os oxigênios ligados ao anel benzênico, eletrostática com resíduo Pro63 e estérica do resíduo Pro61 (Figura 6C).

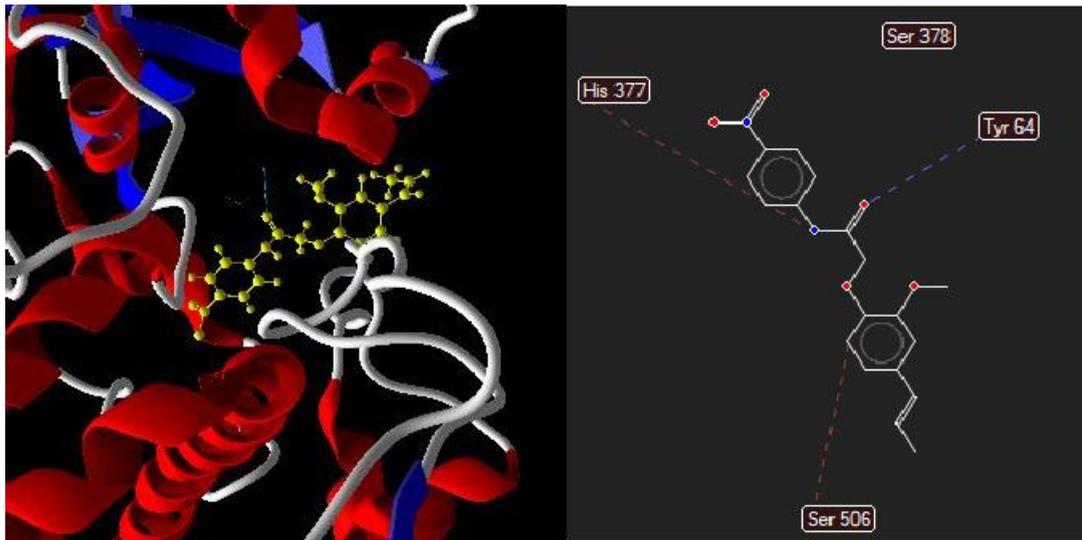


Figura 6A – Interações entre ISO A2 e 14- $\alpha$ -desmetilase. Linhas tracejadas azuis indicam ligações de hidrogênio. Linhas tracejadas vermelhas indicam ligações eletrostáticas.

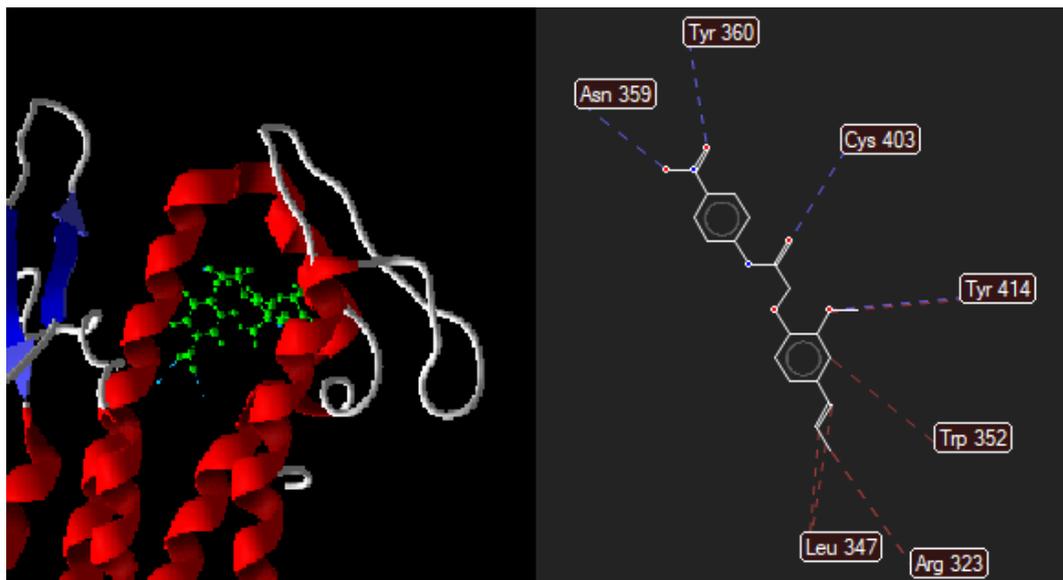


Figura 6B – Interações entre ISO A2 e Delta-14- $\alpha$ -reductase. Linhas tracejadas azuis indicam ligações de hidrogênio. Linhas tracejadas vermelhas indicam ligações eletrostáticas.

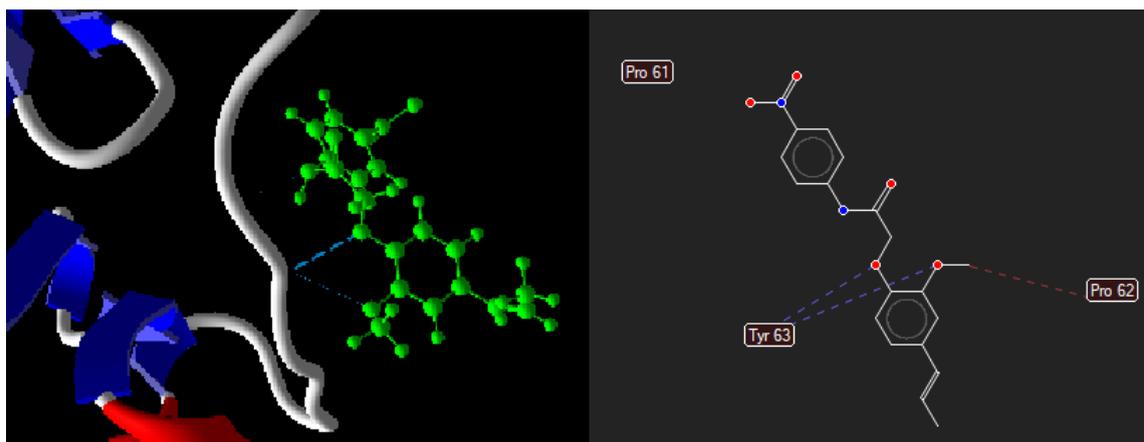


Figura 6C – Interações entre ISO A2 e Lanosterol-14- $\alpha$ -desmetilase. Linhas tracejadas azuis indicam ligações de hidrogênio. Linhas tracejadas vermelhas indicam ligações eletrostáticas.

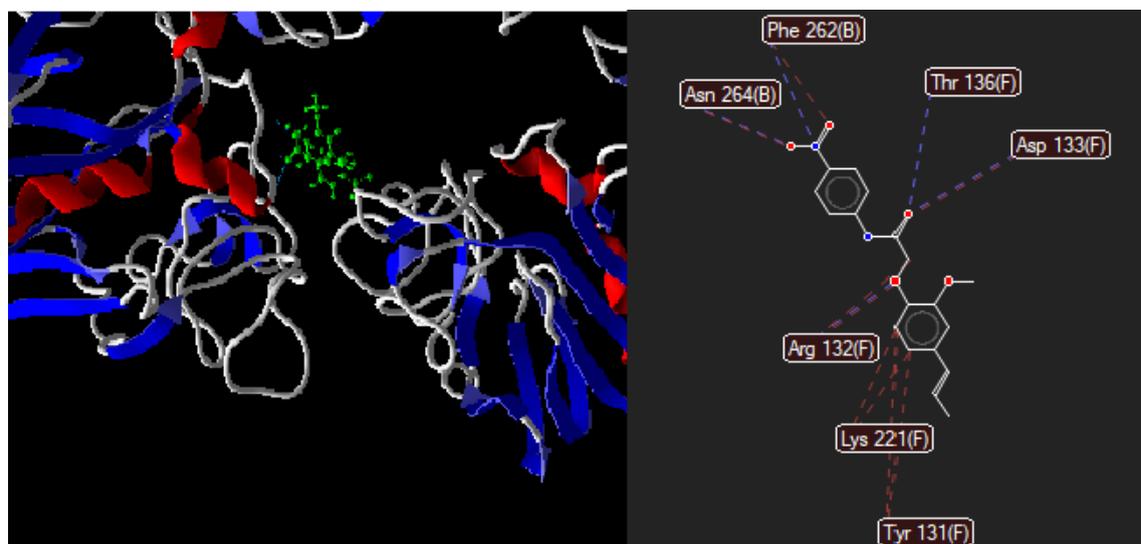


Figura 6D – Interações entre ISO A2 e  $\beta$ -1,3 D-glucano. Linhas tracejadas azuis indicam ligações de hidrogênio. Linhas tracejadas vermelhas indicam ligações eletrostáticas.

#### 4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo indicaram que o isoeugenol tem notável atividade antifúngica. Os dados demonstram que a menor concentração do isoeugenol (CIM<sub>50%</sub>) capaz de inibir o crescimento de *C. albicans* foi 128  $\mu$ g/mL. Resultados semelhantes foram encontrados por Bhatia et al. [39] que relataram

valor da CIM do isoeugenol entre 100-250 µg/mL para *Candida* spp. resistentes e sensíveis ao fluconazol, e por Zemek et al. [40] que determinaram valor da CIM = 100µg/mL do isoeugenol para *Candida albicans*. Em contrapartida, Gallucci et al [41] determinaram que o valor da CIM do isoeugenol capaz de inibir o crescimento de *C. albicans* resistente ao fluconazol foi de 0,17 mg/mL<sup>-1</sup>. Outros estudos revelaram também capacidade do isoeugenol em inibir crescimento de bactérias patogênicas Gram-positivas, Gram-negativas e *Mycobacterium fortuitum* [42], além de fungos do gênero *Aspergillus*, *Saccaromyces* spp. e *Fusarium parasiticus*. [40,42,43].

A CFM do isoeugenol mostrou-se idêntica em todas as cepas analisadas, enquanto que para nistatina o valor da CFM<sub>50%</sub> foi 3X o valor da CIM nas cepas *C. albicans* 11b, *C. albicans* 13b e *C. albicans* ATCC 76485. De acordo com Sindique et al. [32] um composto possui ação fungistática quanto a relação CFM/CIM for ≥4 e fungicida quando CFM/CIM <4. Desta forma, o isoeugenol demonstrou ação fungicida em todas as cepas avaliadas, enquanto que, a nistatina em apenas em 50% das cepas analisadas, conforme mostra tabela 1. Os resultados encontrados por Peixoto et al. [19] corroboram com os observados neste estudo, em que o valor da CFM/CIM do óleo essencial de *Laurus nobilis* (louro) frente a *C. albicans* proveniente da cavidade oral foi <4. Os autores atribuíram a atividade anti-*Candida* de *L. nobilis* ao isoeugenol, composto majoritário (53,5%) encontrado no óleo essencial [19].

A atividade antimicrobiana do isoeugenol pode ser atribuída a parâmetros estruturais e moleculares do fitocomposto, além de variar entre as espécies analisadas e o número de substituintes do anel aromático da molécula [40, 44]. A presença da hidroxila (-OH) livre da cadeia aromática do isoeugenol é um dos parâmetros estruturais envolvidos na atividade antimicrobiana desse fitocomposto, entretanto, propriedades moleculares como hidrofobicidade, refratividade e geometria molecular parecem, também, estar relacionados na capacidade inibitória do isoeugenol sobre *Candida* spp. [40-44].

A capacidade de formação de estruturas de virulência, blastoconídios e pseudo-hifas, por *C. albicans* caracteriza um importante fator de virulência do gênero no processo infeccioso, uma vez que a presença destas estruturas dificulta fagocitose

do patógeno pelas células do sistema imune hospedeiro [45]. O isoeugenol demonstrou ser capaz de reduzir a formação de estruturas de virulência (clamidoconídios, blastoconídios e pseudo-hifas) de *C. albicans*, sugerindo ser um produto eficaz no controle do estabelecimento e progressão de candidíases.

Embora os mecanismos de ação do isoeugenol não estejam totalmente compreendidos, a literatura relata que o fitocomposto é capaz de inibir o crescimento de *Candida* spp. por afetar na formação da parede celular fúngica e desestabilizar a membrana plasmática por meio de sua interação com bombas de prótons H<sup>+</sup>-ATPase acarretando consequentemente destruição do micro-organismo, tendo em vista que esta enzima regula processos fisiológicos importantes para viabilidade das células fúngicas [19,39]

O estudo de associação do isoeugenol com a nistatina sobre *C. albicans* demonstrou como resultado indiferença, ou seja, quando associados os dois compostos não interagiram entre si para atuar de forma negativa ou positiva sobre *C. albicans*. Embora a ausência de interação entre o fitocomposto isoeugenol e a droga padrão nistatina tenha sido observado, os resultados desse estudo não inviabiliza a realização de novas pesquisas que busque o perfil de interação do isoeugenol com outras drogas antifúngicas licenciadas ou moléculas naturais.

Abourashed et al. [46], analisou o efeito combinatório do isoeugenol com as moléculas naturais 6-paradol e 6-shogaol contra *C. albicans* e do isoeugenol com antibiótico isoniazida contra *Mycobacterium smegmatis* e obteve como resultado forte sinergismo entre os compostos avaliados sobre *C. albicans* e *M. smegmatis*. Desta forma, novos estudos devem ser realizados para avaliar o perfil de associação do isoeugenol com antimicrobianos de distintas classes e seu efeito potencializador com outras moléculas naturais de ação antimicrobiana.

Estudos para elucidar atividades biológicas de distintas moléculas, empregando os métodos *in vitro* e *in silico*, podem ser realizados concomitantemente com objetivo de ilustrar as possíveis interações existentes entre moléculas testes e o sítio ativo dos micro-organismos alvo [15].

A avaliação dos possíveis mecanismos de ação do isoeugenol, pelo método *in silico* de acoplamento molecular, mostrou que o fitocomposto possivelmente atua

na biossíntese da membrana plasmática de *Candida*, uma vez que os melhores valores de energia de ligação foram demonstrados no acoplamento com as enzimas delta-14- $\alpha$ -redutase e 14- $\alpha$ -desmetilase, responsáveis pela formação do principal esterol presente na membrana plasmática fúngica: o ergosterol [35,36]. O melhor valor de interação da energia de ligação da molécula ISO A2 foi com a enzima  $\beta$ -1,3 glucano indicando que o possível alvo de ação dessa molécula é a interferência na biossíntese da parede celular fúngica [47].

A literatura não relata nenhum outro estudo que mostre interações entre isoeugenol e as enzimas avaliadas, confirmando a necessidade de maiores estudos que vise elucidar o potencial antifúngico do isoeugenol sobre a biossíntese de estruturas essenciais a viabilidade celular fúngica.

## **CONCLUSÃO**

Os dados obtidos neste estudo permitiram concluir que o isoeugenol demonstrou efetiva atividade antifúngica sobre isolados de *C. albicans*, sendo capaz de interferir na formação das estruturas blastoconídios e clamidoconídios, importantes no processo de patogenicidade da espécie. O estudo de ancoragem molecular revelou que o isoeugenol tem potencial inibidor das enzimas 14- $\alpha$ - desmetilase, delta-14-esterol redutase, lanosterol-14- $\alpha$ -desmetilase e  $\beta$ -1,3, glucano.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo auxílio financeiro concedido aos pesquisadores. A Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO/UFPB) pelo suporte estrutural. A Jéssika Viana pelo auxílio a realização do docking molecular.

## REFERÊNCIAS

- [1] Pereira, DC; Backes, LTH; Calil, LN; Fuentefria, AM. A six-year epidemiological survey of vulvovaginal candidiasis in cytopathology reports in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Revista de Patologia Tropical*, 2012, 41 (2), 163-168.
- [2] Colombo, AL; Guimarães, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2003, 36 (5), 599-607. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v36n5/a10v36n5.pdf>
- [3] Bassetti, M; Merelli, M; Righi, E; Diaz-Martin, A; Rosello, EM, Luzzari, R; Parra, A; Treccarichi, EM, Sanguinetti, M; Posteraro, B; Garnacho-Montero, J; Sartor, A; Rello, J; Tumbello, M. Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility, and outcome of candidemia across five in Italy and Spain. *J. Clin. Microbiol.*, 2013, 51 (12), 4167-4172. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3838046/>
- [4] Khan, MAS; Ahmad, I; Cameotra, SS. Phenyl aldehyde and propanoids exert multiple sites of action towards cell membrane and cell wall targeting ergosterol in *Candida albicans*. *AMB Express*, 2013, 3 (54), 2-16. Disponível em: <http://www.amb-express.com/content/3/1/54>
- [5] Yapar, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Ther. Clin. Risk Manag.*, 2014, 10, 95-105. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3928396/>
- [6] Castro, RD; Souza, TMPA; Bezerra, LMD, Ferreira, GLS, Costa, EMMB; Cavalcanti, AL. Antifungal activity and mode action of thymol and its synergism with nystatin against *Candida* species involved with infections in the oral cavity: an *in vitro* study. *BMC Complement. Altern. Med.*, 2015, 15 (417), 1-7. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4659158/#>
- [7] Kalaiarasan, K; Singh, R; Chaturvedula, L. Changing virulence factors amongs vaginal non-*albicans Candida* species. *Indian J Med Microbiol*, 2018, 36, 364-368. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30429388>
- [8] Mayer, FL; Wilson, D; Hube, B. *Candida albicans* pathogenesis mechanisms. *Virulence*, 2013, 4 (2), 119-128. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3654610/>
- [9] Williams, D; Lewis, M. Pathogenesis and treatment of oral candidoses. *J. Oral Microbiol*, 2011, 3, 1-11. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3087208/>
- [10] Millsop, JW; Fazel, N. Oral candidiasis. *Clin. Dermatol*, 2016, 34 (4), 487-494. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27343964>

- [11] Silva, S; Rodrigues, CF; Araújo, D; Rodrigues, ME; Henrique, M. Candida species biofilms antifungal resistance. J Fungi, 2017, 3 (1). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5715972/>
- [12] García-Cuesta, C; Sarrion-Pérez, MG; Bagán, JV. Current treatment of oral candidiasis: a literature review. J Clin Exp Dent, 2014, 6 (5). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4312689/>
- [13] Murray, PR.; Rosenthal, KS; Pfaller, MA. Microbiologia Médica, 7ª ed.; Elsevier: Rio de Janeiro, 2014.
- [14] Hipólito, TMM; Bastos, GTL; Barbosa, TWL; Souza, TB; Coelho, LFL; Dias, ALT; Rodríguez, IC; Santos, MH; Dias, DF; Franco, LL; Carvalho, DT. Synthesis, activity and docking studies of eugenol-based glucosides as new agents against *Candida* sp. Chem Biol Drug Des, 2018, 92 (2), 1514-1524.
- [15] Zarlaha, A; Kourkoumelis, N; Stanojkovic, TP; Kovala-Demertri, D. Cytotoxic activity of essential oil and extracts of *Ocimum basilicum* against human carcinoma cells. Molecular docking study of isoeugenol as a potent cox and lox inhibitor. Dig J Nanomater Biostruct, 2014, 9 (3), 907-917.
- [16] Freire, JCP; Júnior, JKO; Silva, DF; Sousa, JP; Guerra, FQS; Lima, EO. Antifungal activity of essential oils against *Candida albicans* strains isolated from users of dental prostheses. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2017. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2017/7158756/>
- [17] D'Souza, SP; Channavanar, SV; Kanchanashri, B; Niveditha, SB. Pharmaceutical perspectives of spices and condiments as alternative antimicrobial remedy. J Evid Based Complementary Altern Med, 2017, 22 (4), 1002-1010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5871277/>
- [18] Afonso, RS; Rennó, MN; Slana, GBCA; França, TCC. Aspectos químicos e biológicos do óleo essencial de cravo da Índia. Rev Virtual Quím, 2012, 4 (2): 146-161. Disponível em: <http://rvq.sbgq.org.br/imagebank/pdf/v4n2a05.pdf>
- [19] Peixoto, LR; Rosalen, PL; Ferreira, GLS; Freires, IA; Carvalho, FG; Castellano, LR; Castro, RD. Antifungal activity, mode of action and anti-biofilm effects of *Laurus nobilis* Linnaeus essential oil against *Candida* spp. Arch Oral Biol, 2017, 73, 179-185.
- [20] Jukié, M; Politeo, O; Milos, M. Chemical Composition and antioxidant effect of free volatile aglycones from nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.) compared to its essential oil. Croat Chem Acta, 2006, 79 (2), 209-214.
- [21] Solacka, D. Role of phenylpropanoid compounds in plant responses to different stress factors. Acta Physiol Plant, 1997, 19 (3), 257-268.

- [22] Óleos essenciais. Org. Metabolismo secundário das plantas. <http://www.oleosessenciais.org/metabolismo-secundario-das-plantas/>. (Acessado em: 24 de novembro de 2018).
- [23] Maia, JGS; Andrade, EHA. Database of the amazon aromatic plants and their essential oils. *Quim Nova*, 2009, 32 (3), 595-622. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422009000300006](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000300006)
- [24] Gallucci, MN; Carezzano, ME; Oliva, MM; Demo, MS; Pizzolitto, RP; Zunino, MP; Zygadlo, JÁ; Dambolema, JS. In vitro activity of natural phenolic compounds against fluconazole-resistant *Candida* species: a quantitative structure–activity relationship analysis. *J Appl Microbiol*, 2014, 116, 795-804. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jam.12432>
- [25] Kiessling A, Johansson D, Zahl IH, Samuelsen OB. Pharmacokinetics, plasma cortisol and effectiveness of benzocaine, MS-222 and isoeugenol measured in individual dorsal aorta-cannulated Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*. 2009; 286 (3-4): 301-308
- [26] CLSI. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts – 2ª Ed.* CLSI document M27-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2002.
- [27] Cleeland, R; Squires, E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections. In: *Antibiotics in Laboratory Medicine*, Ed: V.M.D. Lorian. Williams & Wilkins, 1991.
- [28] Hadacek, F; Greger, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical Analysis*, 2000, 11 (3), 137-147.
- [29] Konemam, EW; Allen, SD; Janda, WM; Schreckenberger, PC; Winn Junior, W.C. *Diagnóstico microbiológico*, 5ª ed. MEDS: Rio de Janeiro, 2001.
- [30] Ostrosky, EA; Mizumoto, MK; Lima, MEL; Kaneko, TM; Nishikawa, SO, Freitas, BR. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Rev Bras Farmacogn*, 2008, 18 (2), 301-307. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-695X2008000200026](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2008000200026)
- [31] Morales, G; Paredes, A; Sierra, P, Loyola, LA. Antimicrobial activity of three baccharis species used in the tradicional medicine of Northern Chile. *Molecules*, 2008, 13 (4), 790-794. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/13/4/790>

- [32] Siddique, ZN; Farooq, F; Musthafa, TNM; Ahmad, A; Khan, AU. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. *Journal of Saudi Chemical Society*, 2013, 17 (2), 316-333. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S131961031100069X>
- [33] Shin, S. Anti-*Aspergillus* activities of plant essential oils and their combination effects with-ketoconazole or amphotericin b. *Arch Pharm Res*, 2003, 26 (5), 389-393.
- [34] Odds, FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother*, 2003, 52 (1), 1. Disponível em: <https://academic.oup.com/jac/article/52/1/1/930000>
- [35] Strushkevich, N. Usanov, S.A.; Park, H.W. Structural basis of human CYP51 inhibition by antifungal azoles. *Journal of molecular biology*, 2010, 397(4), 1067-1078. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283610001324>.
- [36] Li, X; Roberti, R; Blobel, G. Structure of an integral membrane sterol reductase from *Methylomicrobium alcaliphilum*. *Nature*, 2015, 517(7532), 104. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature13797>.
- [37] Garlatti, V; Belloy, N; Martin, L; Lacroix, M; Matsushita, M; Endo, Y; Fujita, T; Camps, JCF.; Arlaud, GJ; Thielens, NM; Gaboriaud, C. Structural insights into the innate immune recognition specificities of L-and H-ficolins. *The EMBO Journal*, 2007, 26(2), 623-633. Disponível em: <http://emboj.embopress.org/content/26/2/623>.
- [38] Harshbarger, W. Crystal Structures of Binary and Ternary Complexes of Thymidylate Synthase (ThyA) from *Mycobacterium tuberculosis*: Insights into Selectivity and Inhibition. Doctoral dissertation, Texas A&M University: Texas, August 2011. Disponível em: <https://oaktrust.library.tamu.edu/handle/1969.1/ETD-TAMU-2011-08-9992>.
- [39] Bhatia, R; Shreaz, S; Khan, N; Muralidhar, S; Basir, SF; Manzoor, N; Khan, LA. Proton pumping ATPase mediated fungicidal activity of two essential oil components. *J Basic Microbiol*, 2012, 52 (5), 504-512.
- [40] Zemek, J; Košíková, B; Augustín, J; Joniak, D. Antibiotic properties of lignin components. *Folia Microbiol*, 1979, 24, 483-486.
- [41] Gallucci, MN; Carezzano, ME; Oliva, MM; Demo, MS; Pizzolito, RP; Zunino, MP; Zygadlo, JA; Dambolena, JS. In vitro activity of natural phenolic compounds against fluconazole-resistant *Candida* species: a quantitative structure-activity relationship analysis. *J Appl Microbiol*, 2014, 116 (4), 795-804. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jam.12432>

- [42] Laekeman, GM; Hoof, LV; Haermers, A; Berghe, DAV; Herman, AG; Vlietinck, AJ. Eugenol a valuable compound for in vitro experimental research and worthwhile for further in vivo investigation. *Phytither Res*, 1990, 4 (3), 90-96.
- [42] Pizzolito, RP; Barberis, CL; Dambolema, JS; Herrera, JM; Zunino, MP; Magnoli, CE; Rubinstein, HR; Zyglalo, J; Dalcerro, AM. Inhibitory effect of natural phenolic compounds on *Aspergillus parasiticus* growth. *Journal of chemistry*, 2015. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/jchem/2015/547925/>
- [43] Dambolena, JS; López, AG; Meriles, JM; Rubistien, HR; Zygadlo, JA. Inhibitory effect of 10 natural phenolic compounds on *Fusarium verticillioides*. A structure-property- activity relationship study. *Food Control*, 2012, 28 (1), 163-170.
- [44] Hyldgaard, M; Mygind, T; Meyer, RL. Essential oil in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers Microbiol*, 2012, 3 (12), 1-24. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3265747/>
- [45] De Rossi, T; Lozovoy, MAB; Silva, RV; Fernandes, EV; Geraldino, TH; Costa, IC; Saridakis, HO; Watanabe, AE; Felipe, I. Interações entre *Candida albicans* e hospedeiro. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, 2011, 32 (1), 15-28.
- [46] Abourashed, EA; Galal, AM; Shebl, AM; Mossa, JS. Enhancing effect of isoeugenol on the antimicrobial activity of isoniazid, 6- paradol and 6- shogaol. *J Herbs, Spices & Medicinal Plant*, 2013, 13 (4), 95-103.
- [47] Douglas, MC. Fungal  $\beta$  (1,3)-d-glucano synthesis. *Medical Micology*, 2001, 39 (1), 55-66. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11800269>

#### 4. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Candidíase bucal é uma infecção fúngica oportunista ocasionada por leveduras do gênero *Candida*, que colonizam naturalmente trato respiratório, gastrointestinal, vulvovaginal e mucosa bucal de indivíduos saudáveis. É uma doença que acomete habitualmente indivíduos imunocomprometidos ou que apresentam fatores predisponentes para o desenvolvimento da patologia, como alterações hormonais, fisiológicas ou até mesmo uso de próteses dentárias.

O gênero apresenta atualmente cerca de 150-200 espécies descritas, entretanto apenas 15 são patogênicas ao homem, sendo *C. albicans* a espécie mais prevalente em candidíases bucais. Entre as espécies não-*albicans* é significativamente crescente o número de estudos epidemiológicos que relatam *C. tropicalis* e *C. glabrata* como agentes infecciosos da candidíase bucal.

O tratamento desta patologia dá-se inicialmente pelo uso tópico da nistatina e em caso de insucesso parte-se para o uso de drogas licenciadas de ação sistêmica, entretanto algumas limitações têm dificultado o tratamento da candidíase bucal, como número limitado de moléculas com ação antifúngica, aumento de terapias imunossupressoras e crescente resistência microbiana aos fármacos disponíveis.

Entre as possíveis alternativas para suprir as limitações da monoterapia convencional no tratamento da candidíase bucal, o uso de plantas medicinais e/ou produtos naturais, isolados ou em combinação a antifúngicos licenciados, tem demonstrado resultados positivos e permitido o aumento na quantidade de estudos que comprove sua ação sobre fungos do gênero *Candida*.

Desta forma, considerando a importância clínica e epidemiológica da candidíase bucal e a escassez de estudos sobre ação antifúngica do fitoconstituente isoeugenol, o presente estudo teve como objetivo avaliar atividade antifúngica *in vitro* do isoeugenol e moléculas sintéticas sobre isolados clínicos de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* da cavidade bucal, verificar ação desse fitocomposto sobre a micromorfologia de estruturas de virulência dessas espécies, sua ação em conjunto com antifúngico padrão nistatina pelo método *checkerboard*, bem como avaliar o possível mecanismo de ação utilizando como metodologia acoplamento

molecular das substâncias testes com proteínas importantes para viabilidade celular das espécies fúngicas.

Entre as limitações encontradas neste estudo podemos citar: ausência de ensaios *in vitro* que vise elucidar o mecanismo de ação do isoeugenol sobre *Candida* spp., assim como efeito citotóxico do fitocomposto sobre células eritrocitárias humana, atividade antibiofilme uni e multiespécie de *Candida* spp. e outros patógenos e estudos de associação do isoeugenol com outras classes de drogas antifúngicas.

No entanto, os pesquisadores pretendem continuar com estudos sobre atividade antifúngica do isoeugenol, tendo como objetivo sanar limitações presentes neste estudo e obter maior conhecimento da ação desse fitocomposto como propenso futuro fármaco.

Desta forma, os resultados obtidos neste estudo servem para embasar estudos futuros sobre a potencial ação antifúngica do isoeugenol sobre *Candida* spp. e outras espécies fúngicas; e elucidar, pelo método *in silico*, os possíveis mecanismos de ação desse fitocomposto sobre células de *Candida*.

## 5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que o isoeugenol demonstrou propensa capacidade antifúngica frente aos isolados de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, exibindo valor da CIM 128 µg/mL em 70% das amostras. O produto apresentou atividade fungicida sobre os isolados estudados, atuando também sobre a micromorfologia do fungo e interferindo no desenvolvimento de estruturas blastoconídios e pseudo-hifas das cepas avaliadas. Quanto a atividade moduladora do isoeugenol e nistatina pode-se perceber que o isoeugenol demonstrou atividade sinérgica sobre cepas de *C. tropicalis* LM-13803, indicando que seu uso em combinação com a nistatina potencializa a ação farmacológica deste fármaco. O estudo de acoplamento molecular demonstrou que os possíveis mecanismos de ação do isoeugenol pode estar relacionado a interferência da molécula na formação da membrana plasmática fúngica, uma vez que a molécula apresentou melhor interação com as enzimas delta-14-esterol redutase e 14- $\alpha$ -desmetilase, participantes no processo de biossíntese da membrana plasmática de *Candida*.

## REFERÊNCIAS\*

1. Mourão PHO, Magalhães PP, Mendes EN. Microbiota Indígena de Seres Humanos. Rev Med Minas Gerais. 2005; 15 (3): 177-184.
2. Simões RJ, Fonseca P, Figueiral MH. Infecções por *Candida* spp. na cavidade oral. Odont. Clin.-Cient. 2013; 12 (1): 19-22.
3. Parahitiyawa NB, Scully C, Leung WK, Jin LJ, Samaranayake LP. Exploring the oral bacterial flora: current status and future directions. Oral Diseases. 2010; 16: 136-145.
4. Bonner M, Amard V, Bar-Pinatel C, Charpentier F, Chatard JM, Desmuyck Y, et al. Detection of the amoeba *Entamoeba gingivalis* in periodontal pockets. Parasite. 2014; 21 (30): 1-9.
5. Sultan AS, Kong EF, Rizk AM, Jabra-Rizk MA. The oral microbiome: A Lesson in coexistence. PLoS Pathog. 2018; 14 (1): 1-6.
6. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. J Clin.Microbiol. 2005; 43 (11): 5721-5732.
7. Geraldino TH, Costa TMPS, Brunnuell CR, Cunha NV, Micheletti P, Costa IC, Felipe I. Dimorfismo, produção de enzimas funcionais e adesinas de *Candida albicans*: mini revisão. Biosaúde. 2012; 14 (1): 26-36.
8. Giolo MP, Svidzinski TIE. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. J Bras Patol Med Lab. 2010; 46 (3): 225-234.
9. Siqueira JSS, Arley SJ, Ferreira MF, Torres SR. Candidíase oral em pacientes internados em UTI. Rev. Bras Odontol. 2014; 71 (2): 176-179.
10. Barbedo LS, Sgarbi DBG. Candidíase. J Bras Doenças Sex Transm. 2010; 22 (1): 22-38.
11. Millsop JW, Fazel N. Oral candidiasis. Clin. Dermatol. 2016; 34 (4): 487-494.
12. Andreola P, Demathé A, Galafassi D, Elsemann EB, Elsemann RB, Gazzoni AF. Estudo comparativo entre produção de fosfolipases extracelulares e proteinases do gênero *Candida* isoladas a partir de infecções da cavidade oral. Rev Odontol UNESP. 2016; 45 (4): 219-226.
13. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. Virulence. 2013; 4 (2): 119-128.

14. De Rossi T, Lozovoy MAB, Silva RV, Fernandes EV, Geraldino TH, Costa IC et al. Interações entre *Candida albicans* e hospedeiro. Semina: Ciênc. Biol. e Saúde. 2011; 32 (1): 15-28.
15. Hartmann A, Missio R, Hammad MP, Alves IA. Incidência de *Candida* spp. de pacientes infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) no município de Santo Ângelo-RS. Rev. Epidemiol. Control. Infec. Santa Cruz do Sul. 2016; 6 (3): 125-130.
16. Patil S, Doni B, Maheshwari S. Prevalence and Distribution of Oral Mucosal Lesions in a Geriatric Indian Population. Can Geriatr J. 2015;18(1):11–14.
17. Peixoto JV, Rocha MG, Nascimento RTL, Moreira VV, Kashiwabara TGB. Candidíase – Uma revisão de literatura. Braz. J. Surg. Clin. Research. 2014; 8 (2): 75-82.
18. Matos AL, De Sá MAB, Pereira MM, Oliveira SKM, Texeira NNS, Freitas DA. Lesões bucais na infância: revisão sistemática de interesse na fonoaudiologia. Revista CEFAC – Speech, Language, Hearing Sciences and Education Journal. 2016; 18 (1): 209-2013.
19. Martins Neto M, Danesi CC, Unfer DT. Candidíase bucal. Saúde. 2005; 31 (1-2): 16-26.
20. Arnoud RR, Soares MSM, Santos, MGC, Santos RC. Estomatite protética: prevalência e correção com idade e gênero. Rev. Bras. Cien. Saude. 2012; 16 (1): 59-62.
21. Farias ABL, Cardoso AJO, Cardoso, SO, Filho MGO, Cardoso MSO. Lesões de mucosa oral em pacientes portadores de próteses dentárias: ilustrações clínicas e abordagem preventiva. Rev. Odonto. 2008; 16 (31): 19-26.
22. Santos MJ, Santana CL, Andrade RCDV, Fraga TL, Prado FO. Prevalência de lesões microbianas bucais e usuários de prótese dentária cadastrados em uma Unidade de Saúde da Família em Jaquié-BA. Arch Health Invest. 2016; 5(3): 176-181.
23. Galleta VC, Campos MS, Hirota SK, Migliari DA. Candidose hiperplásica em paletó desenvolvida por contato à glossite romboide mediana. Braz. J. Otorhinolaryngol. 2010; 76 (1): 137.
24. Lavra ZMM, Sônego F, Silva RMF, Medeiros FPM. Desenvolvimento e validação de método analítico para nistatina creme vaginal por cromatografia líquida de alta eficiência. Rev. Bras. Cienc. Farm. 2008; 44 (4): 637-643.

25. Cuenca-Estrella M. Antifúngicos en el tratamiento de las infecciones sistémicas: importancia del mecanismo de acción, espectro de actividad y resistencias. *Rev. Esp. Quimioter.* 2010; 23 (4): 169-176.
26. Rezende C, Segura R, Riva SBM, Castro VCO. Mecanismo de ação dos antifúngicos. *Rev. Unifev: Ciência e Tecnologia.* 2017 [acesso em 2018 ago. 14]; 2 (2): 222-236. Disponível em: <http://periodicos.unifev.edu.br/index.php/RevistaUnifev/article/view/93>.
27. Müller GG, Kara-José N, Castro RS. Antifúngicos em infecções oculares: drogas e vias de administração. *Rev. Bras. Oftalmol.* 2013; 72 (2): 132-141.
28. França RRF, Carvalho AS, Branco FSC, Pinto AC, Boechat N. Inibidores potentes da enzima esterol 14 $\alpha$ -desmetilase contra *Trypanosoma cruzi*. *Ver. Virtual Quim.* 2014; 6 (5): 1483-1516.
29. Viera F, Nascimento T. Resistência a fármacos antifúngicos por *Candida* e abordagem terapêutica. *Rev. Part. Farmacoter.* 2017; 9: 161-168.
30. Odds FC. Editorial: resistance to antifungal agents. *Fungal Genet. Biol.* 2010; 47 (2):190.
31. Arthington-Skaggs BA, Rex JH. Resistance to Antifungal Agents. In: Fong IW, Drlica K. Antimicrobial resistance and implications for the 21th century. Springer. 2008
32. Sanguinetti M, Posteraro B, Lass-Flörl C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. *Mycoses.* 2015; 58(2): 2-13.
33. Brasil, Ministério da Saúde. A fitoterapia no SUS e o programa de pesquisas de plantas medicinais da central de medicamentos. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2006.
34. Rodrigues AP, Andrade LHC. Levantamento etnobotânico das plantas medicinais utilizadas pela comunidade de Inhamã, Pernambuco Nordeste do Brasil. *Braz. J. Med. Plants.* 2014; 16 (3): 721-30.
35. Lima IEO, Nascimento, LAM, Silva MS. Comercialização de plantas medicinais do município de Arapiraca-AL. *Braz. J. Med. Plants.* 2016; 18(2):462-472.
36. Silva NL, Bezerra RA, Costa FN, Rocha MMNP, Pereira SLS. Avaliação do efeito do extrato da casca do cajueiro sobre microrganismos de biofilme subgingival. Estudo experimental *in vitro*. *J. Periodontol. Brazil.* 2013; 23 (4): 26-30.

37. Neto AJR, Barros RFM, Silva PRR. Uso de plantas medicinais do Passa-Tempo, estado do Piauí, nordeste do Brasil. Rev. Bras. Biocienc. 2015; 13 (3): 165-175.
38. Costa JC, Marinho MG. Etnobotânica de plantas medicinais em duas comunidades do município de Picuí, Paraíba, Brasil. Rev. Bras. Pl. Med. 2016; 18 (1): 125-134
39. Marinho MG, Silva CC, Andrade LHC. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais em área de caatinga no município de São José dos Espinharas, Paraíba, Brasil. Rev. Bras. Pl. Med. 2011; 13 (2): 170-182.
40. Santos EB, Dantas GS, Santos HB, Diniz MFFM, Sampaio FC. Estudo etnobotânico de plantas medicinais para problemas bucais no município de João Pessoa, Brasil. Rev. Bras. Farmacogn. 2009; 19 (1): 321-324.
41. Leite MCA, Bezerra APB, Sousa JP, Guerra FQS, Lima EO. Evaluation of antifungal activity and mechanism of action of citral against *Candida albicans*. Evid. Based. Complement. Alternat. Med. 2014: 1-9.
42. Freire JCP, Júnior JKO, Silva DF, Sousa JP, Guerra FQS, Lima EO. Antifungal activity of essential oils against *Candida albicans* strains isolated from users of dental prostheses. Evid. Based. Complement. Alternat. Med. 2017: 1-9.
43. Khan MSA, Ahmad I. Antibiofilm activity of certain phytochemicals and their synergy with fluconazole against *Candida albicans* and biofilm. J. Anticomb. Chemother. 2012; 67 (3): 618-621.
44. Ahmad A, Wani MY, Khan A, Manzoor N, Malepo J. Synergistic Interactions of Eugenol-tosylate and its congeners with fluconazole against *Candida albicans*. PLoS ONE. 2015; 10 (12): 1-19.
45. Gadea I, Mensa J. Potential de anidulafungina em la terapia combinada. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2008; 26 (14): 51-55.
46. Ha JF, Italiano CM, Heath CH, Shih S, Rea S, Wood FM. Candidemia and invasive candidiasis: a review of the literature for the burns surgeon. Burns. 2011; 37 (2): 181-195.
47. Castro RD, Souza TPA, Bezerra LMD, Ferreira GLS, Costa EMMBC, Calvacanti AL. Antifungal activity and mode of action of thymol and its synergism with nystatin against *Candida* species involved with infections in the oral cavity: an *in vitro* study. BMC Complement. Altern. Med. 2015; 15 (417): 1-7.

48. Silva F, Ferreira S, Duarte A, Mendonça DI, Domingues FC. Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against *Candida* and potential synergism with amphotericin B. *Phytomedicine*. 2011; 19 (1): 42-47.
49. Essid R, Hammami M, Gharbi D, Karkouch I, Hamouda TB, Elkahoui S, Limam F, Tabbene O. Antifungal mechanism of the combination of *Cinnamomum verum* and *Pelargonium graveolens* essential oil with fluconazole against pathogenic *Candida* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2017; 101: 6993-7006.
50. Khan MSA, Malik A, Ahmad I. Anti-candidal activity of essential oils alone and in combination with amphotericin B or fluconazole against multi-drug resistant isolates of *Candida albicans*. *Med. Mycol.* 2012; 50 (1): 33-42.
51. Nazarro F, Fratianni F, Coppola R, De Feo V. Essential oil and antifungal activity. *Pharmaceuticals*. 2017; 10 (86): 1-20.
52. Essid R, Rahali FZ, Mssada K, Sghair I, Hammami M, Bouratbine A, Aoun K, Limam F. Antileishmanial and cytotoxic potential of essential oils from medicinal plants in northern Tunisia. *Ind. Crops. Prod.* 2015; 77 (23): 795-802.
53. Khan MSA, Ahmad I, Cameotra SS. Phenyl aldehyde and propanoids exert multiple sites of action towards cell membrane and cell wall targeting ergosterol in *Candida albicans*. *AMB Express*. 2013; 3 (54): 1-16.
54. Carvalho AA, Andrade LN, Sousa EBV, Sousa DP. Antitumor phenylpropanoids found in essential oil. *Biomed. Res. Int.* 2015: 1-21.
55. Vogt T. Phenylpropanoids biosynthesis. *Mol. Plant*. 2010; 3 (1): 2-20.
56. Solacka D. Role of phenylpropanoid compounds in plant responses to different stress factors. *Acta. Physiol. Plant.* 1997; 19 (3): 257-268.
57. Leosessenciais [Homepage na internet]. *Metabolismo secundário das plantas*. [Acesso em: 2018 ago 14]. Disponível em: <http://www.oleosessenciais.org/metabolismo-secundario-das-plantas/>
58. Maia JGS, Andrade EHA. Database of the amazon aromatic plants and their essential oils. *Quim. Nova*. 2009; 32 (3): 595-622.
59. Afonso RS, Rennó MN, Slana GBCA, França TCC. Aspectos químicos e biológicos do óleo essencial de cravo da Índia. *Rev. Virtual Quím.* 2012; 4 (2): 146-161.
60. Peixoto LR, Rosalen PL, Ferreira GLS, Freires IA, Carvalho FG, Castellano LR, Castro RD. Antifungal activity, mode of action and anti-biofilm effects of *Laurus*

*nobilis* Linnaeus essential oil against *Candida* spp. Arch. Oral Biol. 2017. (73): 179-185.

61. Jukié M, Politeo O, Milos M. Chemical Composition and antioxidant effect of free volatile aglycones from nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.) compared to its essential oil. Croat. Chem. Acta. 2006; 79 (2): 209-214.

62. Zallara A, Kourkoumelis N, Stanojkovic TP, Kovala-Demertzi D. Cytotoxic activity of essential oil and extracts of *Ocimum basilicum* against human carcinoma cells. molecular docking study of isoeugenol as a potent cox and lox inhibitor. Dig. J. Nanomater. Biostruct. 2014; 9 (3): 907-9017.

63. National Center of Biotechnology Information. PubChem Compound Database. CID: 853433. 2018 [Acesso em 2018 ago. 14]. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/853433>.

64. Galucci MN, Carezzano ME, Oliva MM, Demo MS, Pizzolitto RP, Zunino MP, Zygadlo JA, Dambolema JS. In vitro activity of natural phenolic compounds against fluconazole-resistant *Candida* species: a quantitative structure–activity relationship analysis. J. Appl. Microbiol. 2014; 116: 795-804.

65. Kiessling A, Johansson D, Zahl IH, Samuelsen OB. Pharmacokinetics, plasma cortisol and effectiveness of benzocaine, MS-222 and isoeugenol measured in individual dorsal aorta-cannulated Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture. 2009; 286 (3-4): 301-308.

66. Bhatia R, Shreaz S, Khan N, Muralidhar S, Basir SF, Manzoor N, Khan LA. Proton pumping ATPase mediated fungicidal activity of two essential oil components. J. Basic Microbiol. 2012; (52): 504-512.

---

\* De acordo com as normas do PPGO/UFPB, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors - Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

**APÊNDICE:** Solicitação de anuência para trabalhar com as cepas *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* pertencente ao Laboratório de Pesquisa: Atividade Antibacteriana e antifúngica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA**  
Centro de Ciências da Saúde  
Departamento de Ciências Farmacêuticas

### SOLICITAÇÃO

Venho solicitar, pelo presente documento, ao Laboratório de Pesquisa: Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos/DCF/CCS/UFPB a aquisição das cepas *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata* isoladas e identificadas a partir de amostras biológicas da cavidade bucal, obtidas pelo Projeto de Pesquisa e Extensão: SaúdeArte: Troca de saberes e de cidadania, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Humanos pelo Protocolo CAAE: 5743516.4.0000.5188, e registradas no referido Laboratório. O objetivo geral da solicitação será o uso das cepas para os ensaios do Projeto de Pesquisa (Mestrado): Avaliação da atividade biológica do isoeugenol e novos derivados sobre cepas do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal, do Programa de Pós-Graduação em Odontologia/CCS/UFPB. Tenho pleno conhecimento de que receberei resposta a qualquer dúvida que possa existir sobre os procedimentos e demais assuntos relativos ao trabalho de pesquisa. E os dados registrados serão direcionados para trabalhos de divulgação e publicação científica, com exclusividade, portanto, não trará complicações legais para o universo do trabalho.

**Pesquisador responsável:** Daianna de Sousa Medeiros/CPF: 061.243.414-56  
- Programa de Pós-graduação em Odontologia  
**Endereço para contato:** Rua Adalgisa Luna de Menezes, nº 865, bloco H, apt 102, Bananeiras, João Pessoa. Tel.: (83) 9 9064-0777. E-mail: daianna\_medeiros@hotmail.com.

De acordo: Profª Drª Titular Edeltrudes de Oliveira Lima/DCF/CCSA/FPB,  
Laboratório de Micologia/Laboratório de Pesquisa: Atividade Antibacteriana e  
Antifúngica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos/DCF.

*Daianne de Sousa Medeiros*

Daianne de Sousa Medeiros  
Pesquisadora Responsável



Edeltrudes de Oliveira Lima  
Cedente do Material

João Pessoa, 22 de novembro de 2017.