

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

ATIVIDADE *IN VITRO* DO (-)-MIRTENOL SOBRE FATORES  
DE VIRULÊNCIA DE *Candida albicans* ISOLADAS DA CAVIDADE  
ORAL

CAMILA MENDES SOARES

SAPIENTIA AEDIFICAT

2024

**CAMILA MENDES SOARES**

**ATIVIDADE *IN VITRO* DO (-)-MIRTENOL SOBRE FATORES  
DE VIRULÊNCIA DE *Candida albicans* ISOLADAS DA CAVIDADE  
ORAL**

***IN VITRO* ACTIVITY OF (-)-MYRTENOL ON VIRULENCE FACTORS  
OF *Candida albicans* ISOLATED FROM THE ORAL CAVITY**

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 Ciências  
Odontológicas

Orientador: Prof. Dr. Walicyranison Plinio da Silva Rocha

João Pessoa

2024

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

S676a Soares, Camila Mendes.

Atividade in vitro do (-)-mirtenol sobre fatores de virulência de *Candida albicans* isoladas da cavidade oral / Camila Mendes Soares. - João Pessoa, 2024.  
73 f. : il.

Orientação: Walicyranison Plínio da Silva Rocha.  
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. *Candida albicans*. 2. Infecções oportunistas. 3. Patogenicidade. 4. Fitoquímicos. 5. Mirtenol. I. Rocha, Walicyranison Plínio da Silva. II. Título.

UFPB/BC

CDU 616.992(043)

Elaborado por CHRISTIANE CASTRO LIMA DA SILVA - CRB-15/865

**Informações Complementares:**

Título em outro idioma: *In vitro* activity of (-)-myrtenol on virulence factors of *Candida albicans* isolated from the oral cavity

Palavras-chave em outro idioma: *Candida albicans*; Opportunistic infections; Pathogenicity; Phytochemicals; Myrtenol.

Área de concentração: Ciências Odontológicas

Linha de Pesquisa: Fisiopatologia dos Tecidos Buco-maxilo-faciais

Banca examinadora: Prof. Dr. Walicyranison Plínio da Silva Rocha (Orientador, UFPB); Prof. Dr. Hugo Ramalho Sarmiento (UFPB); Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho (UFCG).

Data de defesa: 03-10-2024

**Informações acadêmicas e profissionais do(a) aluno(a)**

- ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7171-9504>

- Link do Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/6860506935656290>

**CAMILA MENDES SOARES**

**ATIVIDADE *IN VITRO* DO (-)-MIRTENOL SOBRE FATORES  
DE VIRULÊNCIA DE *Candida albicans* ISOLADAS DA CAVIDADE  
ORAL**

A comissão examinadora abaixo relacionada julgou a Defesa de Dissertação apresentada em sessão pública no dia 03 de Outubro de 2024 e atribuiu o conceito APROVADO(A)

---

Prof. Dr. Walicyranison Plinio da Silva Rocha  
Orientador - UFPB

---

Prof. Dr. Hugo Ramalho Sarmiento  
Examinador - UFPB

---

Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho  
Examinador – UFCG

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais e minha irmã que sempre me apoiaram e dedicaram todos os seus esforços para que eu chegasse até aqui.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu Deus pela dádiva da vida e pela oportunidade de realizar mais um sonho, por ter me sustentando e guiado todos os dias, a Ele toda honra e glória!

Aos meus pais, Antônio José e Sulene Abrantes, que nunca mediram esforços, que batalham todos os dias para que eu possa realizar os meus sonhos, a vocês toda a minha gratidão e reconhecimento. Vocês são fundamentais na minha vida!

A minha irmã, Dra. Raissa Mendes, pelas constantes orações, conselhos, apoio financeiro e por dividir comigo os fardos da caminhada, obrigada por tudo! Agradeço também ao meu cunhado Dr. David Wilker pela constante ajuda durante todo esse período.

Ao meu orientador, Dr. Walicyranison Plínio por todos os ensinamentos, paciência e conselhos, por compartilhar todo o seu conhecimento durante esse mestrado. Você é exemplo de ser humano e profissional sempre solícito e empático, sou certamente abençoada por ter você como meu orientador. Que Deus lhe abençoe e recompense por toda ajuda e apoio dado a mim.

Ao meu namorado, Celso Ferreira, presente de Deus nessa caminhada, agradeço pelo incentivo, conselhos e orações, você torna os meus dias mais leves e felizes.

A todos os professores do PPGO-UFPB que partilharam dos seus conhecimentos e contribuíram com minha formação.

Aos técnicos do laboratório de Micologia clínica e funcionários da UFPB, em especial Fátima (Fafá) e Júlio pelas orientações e ajuda, bem como nossas conversas e momentos de descontração que tornavam os dias de pesquisa mais leves, Deus os abençoe ricamente!

Aos colegas de profissão, mestrado e de pesquisa, em especial o professor Klidenberg Júnior pela ajuda e orientações durante a preparação para a seleção

do mestrado, que Deus lhe abençoe graciosamente em todas as áreas da sua vida.

Aos pacientes que ofertaram as amostras clínicas para que a pesquisa acontecesse desejo saúde plena e uma vida abençoada.

Ao Professor Dr. José Maria Barbosa Filho por ter cedido gentilmente o (-)-mirtenol para a realização da pesquisa.

Aos membros da banca por terem aceitado o convite e por todas as considerações realizadas que são de suma relevância para o aperfeiçoamento desta pesquisa.

Agradeço ao PPGO-UFPB e à Universidade Federal da Paraíba, pelo apoio institucional recebido.

E finalmente aos que durante esses anos de mestrado me ajudaram com orações, palavras e me deram todo o suporte aqui em João Pessoa, que o Senhor os recompense com toda sorte de bênçãos!

## EPÍGRAFE

Porque dele, e por ele, e para ele são todas as coisas;  
glória, pois, a ele eternamente. Amém!  
Romanos 11:36

## RESUMO

*Candida albicans* é uma levedura polimórfica encontrada em diferentes sítios anatômicos do ser humano como a cavidade oral, trato gastrointestinal e mucosa vaginal. Esta espécie é a mais virulenta e prevalente em diversos quadros de candidíase, como a candidíase oral. Entretanto, em condições como imunossupressão associados aos fatores de virulência da espécie facilitam o estabelecimento e manutenção da infecção. Existem diversos estudos voltados à obtenção de compostos bioativos com ação antifúngica, porém poucos voltados para aplicação em fatores de virulência. O presente estudo tem como objetivo avaliar a ação do (-)-mirtenol em fatores de virulência de *Candida albicans*. Foram utilizadas 14 cepas de *C. albicans*, sendo 13 coletadas da mucosa oral de pacientes com candidíase bucal e 1 cepa de referência (ATCC 90028). Os fatores de virulência investigados foram morfogênese, produção de lipase e formação de biofilme. Todos os ensaios foram realizados na ausência e na presença do (-)-mirtenol, utilizando uma concentração inibitória mínima (CIM) de 256 µg/mL determinada pela técnica de microdiluição em microplacas de 96 poços. Em todas as condições avaliadas foi observada a ação do composto, interferindo na expressão dos fatores de virulência: atraso no processo formação de tubos germinativos ( $52\% \pm 10\%$  vs.  $28\% \pm 15\%$ ), redução da capacidade de filamentação ( $3,10 \pm 0,46$  vs.  $2,58 \pm 0,64$ ) no meio líquido e sólido, e comprimento das hifas ( $92,09 \pm 21,34$  vs.  $77,42 \pm 17,56$ ), bem como na formação de biofilme ( $0,18 \pm 0,13$  vs.  $0,10 \pm 0,10$ ) para a maioria das cepas. O (-)-mirtenol também impediu a produção e secreção de lipases. Esse foi o primeiro estudo que avaliou a ação do (-)-mirtenol nos fatores de virulência em isolados clínicos orais de *Candida albicans*, mostrando haver nos ensaios de morfogênese realizados redução significativa na formação de tubo germinativo e filamentação e para a maioria dos isolados redução na formação de biofilme e secreção da enzima lipase. Com isso, é possível destacar o potencial que esse composto possui como recurso terapêutico na inibição do desenvolvimento da candidíase oral.

Palavras-Chave: *Candida albicans*; Infecções oportunistas; Patogenicidade; Fitoquímicos; Mirtenol.

## ABSTRACT

*Candida albicans* is a polymorphic yeast found in different anatomical sites of the human body, such as the oral cavity, gastrointestinal tract, and vaginal mucosa. This species is the most virulent and prevalent in various cases of candidiasis, such as oral candidiasis. However, conditions like immunosuppression, combined with the virulence factors of the species, facilitate the establishment and maintenance of the infection. Several studies focus on obtaining bioactive compounds with antifungal action, but few are aimed at targeting virulence factors. The present study aims to evaluate the action of (-)-myrtenol on the virulence factors of *Candida albicans*. Fourteen strains of *C. albicans* were used, 13 of which were collected from the oral mucosa of patients with oral candidiasis, and one reference strain (ATCC 90028). The virulence factors investigated were morphogenesis, lipase production, and biofilm formation. All assays were performed in the absence and presence of (-)-myrtenol, using a minimum inhibitory concentration (MIC) of 256 µg/mL determined by the microdilution technique in 96-well microplates. In all evaluated conditions, the compound was found to interfere with the expression of virulence factors: delay in germ tube formation ( $52\% \pm 10\%$  vs.  $28\% \pm 15\%$ ), reduction in filamentation capacity ( $3.10 \pm 0.46$  vs.  $2.58 \pm 0.64$ ) in liquid and solid media, and hyphal length ( $92.09 \pm 21.34$  vs.  $77.42 \pm 17.56$ ), as well as biofilm formation ( $0.18 \pm 0.13$  vs.  $0.10 \pm 0.10$ ) for most strains. (-)-myrtenol also prevented the production and secretion of lipases. This was the first study to evaluate the action of (-)-myrtenol on the virulence factors of oral clinical isolates of *Candida albicans*, showing a significant reduction in germ tube formation and filamentation in the morphogenesis assays and, for most isolates, a reduction in biofilm formation and lipase secretion. Therefore, it is possible to highlight the potential of this compound as a therapeutic resource in inhibiting the development of oral candidiasis.

**Keywords:** *Candida albicans*; Opportunistic infections; Pathogenicity; Phytochemicals; Myrtenol

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**AFM** – microscopia de força atômica

**Als** – proteínas da sequência semelhante à aglutinina

**cAMP** – adenosina monofosfato cíclica

**CEOH** – células epiteliais orais humanas

**CSC** – condensado da fumaça do cigarro

**DNA** – ácido desoxirribonucleico

**HIV** – vírus da imunodeficiência humana

**IM** – índice de morfologia

**LIP** – lípase

**Lz** – zona de lípase

**MIC** – concentração inibitória mínima

**MRSA** – *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

**PBS** – solução salina tamponada com fosfato

**PCR** – proteína C reativa

**PKA** – proteína quinase A

**PMMA** – Polimetilmetacrilato

**SAPS** – aspartil proteinases secretoras

**FBS** – soro fetal bovino

**YPD** – Yeast Peptone Dextrose (extrato de levedura peptona dextrose)

## SUMÁRIO

|       |                                                                                  |    |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.    | INTRODUÇÃO .....                                                                 | 12 |
| 2.    | REVISÃO DE LITERATURA.....                                                       | 15 |
| 2.1   | Candidiase oral: aspectos gerais e impacto na qualidade de vida .....            | 15 |
| 2.2   | Fatores de virulência de <i>Candida albicans</i> .....                           | 17 |
| 2.2.1 | Morfogênese .....                                                                | 17 |
| 2.2.2 | Formação de biofilme .....                                                       | 19 |
| 2.2.3 | Enzimas hidrolíticas: fosfolipase, proteinase, hemolisinas, lipase e DNase ..... | 21 |
| 2.3   | Resistência a medicamentos antifúngicos .....                                    | 23 |
| 2.4   | Ação do (-)-mirtenol em <i>Candida albicans</i> .....                            | 25 |
| 3.    | OBJETIVOS .....                                                                  | 27 |
| 3.1   | Objetivo Geral .....                                                             | 27 |
| 3.2   | Objetivos específicos .....                                                      | 27 |
| 4.    | ARTIGO .....                                                                     | 28 |
| 5.    | CONCLUSÃO .....                                                                  | 60 |
|       | REFERÊNCIAS .....                                                                | 61 |
|       | ANEXOS .....                                                                     | 71 |
|       | Normas do periódico .....                                                        | 71 |
|       | Parecer consubstanciado do CEP.....                                              | 72 |

## 1. INTRODUÇÃO

Os fungos são microrganismos eucariontes, heterótrofos e ubíquos, ou seja, que sobrevivem em diferentes ambientes como solo, água, plantas, animais e humanos. São seres que apresentam relevância no meio ambiente fazendo parte da decomposição da matéria orgânica. Na indústria alimentícia são utilizados na produção de queijos, bebidas alcoólicas e pães, além de serem essenciais na indústria farmacêutica na formulação de medicamentos como os antibióticos, a exemplo da penicilina.<sup>1</sup>

Existem gêneros fúngicos como *Histoplasma*, *Coccidioides* e *Paracoccidioides* que são considerados patógenos primários, ou seja, podem desenvolver quadros infecciosos mesmo em indivíduos imunocompetentes. Outros são considerados como patógenos oportunistas, que mediante um desequilíbrio do sistema imunológico do indivíduo encontram condições para se multiplicarem e estabelecerem a infecção, é o caso de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Scedosporium* e espécies de *Candida*<sup>2</sup>. Em relação ao gênero *Candida*, as principais espécies de interesse clínico são: Complexo *Candida albicans*, *Nakaseomyces glabratus* (*C. glabrata*), *C. auris*, *C. tropicalis*, Complexo *C. parapsilosis* e *Pichia kudriavzevii* (*C. krusei*).<sup>1</sup>

*C. albicans* é a principal espécie do gênero, podendo apresentar três morfologias distintas: blastoconídio, pseudo-hifas e hifas verdadeiras. No ser humano faz parte da microbiota da cavidade bucal, vagina e trato gastrointestinal. Apesar de ser uma levedura comensal, em condições predisponentes, como quadros de imunossupressão acarretados por HIV/AIDS, câncer, terapia antibiótica de amplo espectro, quimioterapia, dentre outros podem favorecer o desenvolvimento do quadro infeccioso denominado candidíase.<sup>3</sup>

A candidíase pode apresentar manifestações cutâneas, muco-cutâneas e sistêmicas, afetando áreas intertriginosas, unhas, mucosa oroesofágica e vaginal, além de em casos mais graves, por meio de disseminação hematogênica, comprometer diversos órgãos, podendo acarretar o óbito do paciente<sup>2</sup>

No que diz respeito à cavidade bucal, diversos fatores podem contribuir para o desenvolvimento da candidíase, dentre estes, destaca-se a hipossalivação,

uso de próteses dentárias, higiene oral deficiente, perda da dimensão vertical de oclusão e tabagismo. Nesta região a candidíase apresenta-se clinicamente nas formas pseudomembranosa, eritematosa, estomatite protética, queilite angular, glossite rombóide mediana e candidíase crônica hiperplásica.<sup>4,5</sup>

Além de características relacionadas à fragilidade no sistema imunológico do indivíduo, outro aspecto que precisa ser levado em consideração para o estabelecimento do quadro infeccioso é a expressão dos fatores de virulência das cepas. A morfogênese é a transição entre as morfologias de blastoconídios e hifa verdadeira, observada em *C. albicans*. Este fator de virulência contribui significativamente para estabelecimento da infecção, pois durante o processo de desenvolvimento do tubo germinativo, a hifa verdadeira formada invade os tecidos com maior facilidade, promovendo maior dano local e facilitando o acesso da levedura e consequentemente a sua disseminação pela corrente sanguínea.<sup>6</sup>

Em conjunto com a morfogênese, a produção e secreção de enzimas hidrolíticas também facilitam o processo de invasão tecidual. Entre as classes secretadas por *C. albicans* destaca-se as proteases, fosfolipases e hemolisinas.<sup>6</sup> Estas enzimas atuam promovendo dano tecidual pois possuem como substrato proteínas da matriz extracelular, bem como fosfolipídios de membrana, além de células sanguíneas.<sup>7</sup>

Nos últimos anos vem sendo frequente o relato de cepas de *Candida* apresentando baixa sensibilidade ou resistência aos tratamentos convencionais. Estes, por sua vez, apresentam poucas classes terapêuticas disponíveis no mercado, o que insere as infecções fúngicas, principalmente aquelas associadas ao gênero *Candida*, nos radares de alerta para a saúde pública.<sup>8</sup> Desta forma é salutar o investimento em pesquisas para formulação de novos recursos terapêuticos efetivos contra os fatores de virulência presentes nessa espécie.

Na odontologia o uso de compostos extraídos de plantas para o tratamento de distúrbios bucais é comum. Diversas propriedades farmacológicas são encontradas nos produtos naturais, como analgesia, ação anti-inflamatória e antimicrobiana.<sup>9,10</sup> O mirtenol, um monoterpene pertencente ao grupo dos terpenoides, merece destaque pela sua ação antioxidante, antibacteriana,

antisséptica, anti-inflamatória, gastroprotetora, angiogênica, dentre outras propriedades.<sup>11-13</sup>

O mirtenol, de estrutura química  $C_{10}H_{16}O$  é encontrado principalmente no óleo essencial da espécie *Myrtus communis*, conhecida popularmente como murta comum ou verdadeira, sendo um fitoconstituente amplamente utilizado na produção de alimentos e principalmente medicamentos. Um estudo observou ação antimicrobiana frente a cepas de *C. auris* e *Klebsiella pneumoniae*, bem como a redução de biofilme, através da redução significativa na expressão de genes associados à formação do biofilme (*MRKA*, *FKS1*, *ERG11* E *ALS5*).<sup>14</sup>

Embora existam estudos na literatura sobre as propriedades antifúngicas do mirtenol, pouco é explorado a ação deste isolado frente aos fatores de virulência de *C. albicans*. Mediante o exposto, o presente projeto de pesquisa se propõe a avaliar a ação do (-)-mirtenol frente aos fatores de virulência de *C. albicans*. A hipótese desta pesquisa parte da premissa que (-)-mirtenol possui ação antifúngica contra *C. albicans* e pode por sua vez, reduzir ou até mesmo impedir a expressão dos fatores de virulência desta espécie, reduzindo assim, a sua patogenicidade e tornando-se um recurso em potencial no tratamento da candidíase oral.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Candidíase oral: aspectos gerais e impacto na qualidade de vida

A cavidade oral é habitat de inúmeros microrganismos como vírus, fungos, parasitas, arqueias e bactérias que se fixam em estruturas como dentes, língua, sulco gengival, mucosas de revestimento e orofaringe.<sup>15</sup> Em indivíduos saudáveis, fungos do gênero *Candida* como *C. albicans*, *P. kudriavzevii* (*C. krusei*), *N. glabratus* (*C. glabrata*), *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, entre outras, conseguem colonizar esse ambiente sem trazer prejuízos ao hospedeiro. No entanto, em condições ambientais e fisiológicas ideais, estes microrganismos encontram oportunidades de se multiplicarem e invadirem os tecidos adjacentes, condição patológica conhecida como candidíase oral.<sup>4</sup>

A candidíase oral é descrita como uma infecção fúngica oportunista causada por leveduras pertencentes ao gênero *Candida* sendo *C. albicans* a espécie mais prevalente em cerca de 80% dos casos.<sup>16-18</sup> *Candida albicans* é um fungo comensal de caráter polimórfico podendo se apresentar em três morfologias distintas: blastoconídios, hifas verdadeiras e pseudo-hifas, fenotipicamente mostram-se como colônias pastosas ou cremosas, de aspecto liso ou rugoso e com coloração branco, creme ou amarelada quando cultivadas no meio de cultura ágar Sabouraud Dextrose.<sup>19</sup>

Fatores sistêmicos e locais podem favorecer a quebra do equilíbrio existente entre microrganismo e hospedeiro desencadeando o processo infeccioso. Quadros de imunossupressão encontrados comumente em pacientes com o diagnóstico de HIV, penfigóide, hanseníase, câncer, com doenças hematológicas e nos que fazem tratamento em longo prazo com antibióticos e corticosteróides corroboram para o aparecimento das lesões.<sup>17-21</sup> Localmente, condições como estomatite induzida por radiação, perda da dimensão vertical da oclusão em pacientes edêntulos ou semi-edêntulos, hipossalivação presente em indivíduos com síndrome de Sjögren, próteses dentárias com higienização

precária, displasias epiteliais, entre outros são também meios predisponentes para que a doença ocorra.

Clinicamente a candidíase oral pode se manifestar de diferentes formas, sendo a candidíase pseudomembranosa a mais reconhecida. Esse tipo de candidíase apresenta-se na cavidade bucal com placas esbranquiçadas aderidas à mucosa oral, mas facilmente removidas por meio da raspagem, o que contribui para o seu diagnóstico. Essas placas podem conter hifas, leveduras, além de células descamadas e tecido necrótico.<sup>5</sup>

A candidíase eritematosa é comumente evidenciada por manchas avermelhadas e associadas a sintomatologia dolorosa. Uma forma desse tipo de candidíase é a estomatite protética encontrada em pacientes que utilizam prótese dentária, mas não realizam uma higienização adequada. Essa condição é caracterizada pela presença de petéquias hemorrágicas.<sup>4</sup>

Outras formas de candidíase vistas na cavidade oral são a queilite angular em região de comissura labial, em pacientes com perda dentária e consequentemente da dimensão vertical da oclusão, a glossite rombóide mediana, marcada pela atrofia das papilas linguais, a candidíase crônica hiperplásica/leucoplásica que se diferencia da pseudomembranosa por não ser removível à raspagem e por fim, a candidíase mucocutânea derivada de alterações imunológicas no paciente.<sup>5, 18, 22</sup>

Outro fator a ser considerado no surgimento e evolução da candidíase oral para formas mais graves como a candidemia, além do imunocomprometimento do hospedeiro é a expressão dos fatores de virulência presentes nessa cepa. Mecanismos como adesão a células epiteliais, variação fenotípica, atividade de enzimas líticas e formação do biofilme conferem ao fungo uma habilidade maior de ludibriar o sistema imunológico e ocasionar o processo infeccioso.<sup>23</sup>

## 2.2 Fatores de virulência de *Candida albicans*

### 2.2.1 Morfogênese

Algumas espécies de levedura como *C. albicans* são denominadas polimórficas, ou seja, podem exibir três morfologias distintas: blastoconídios, hifas verdadeiras ou pseudo-hifas, essa transição de forma é denominada morfogênese.<sup>25</sup> Blastoconídios podem estar relacionados ao início da infecção enquanto que a formação de hifas e pseudo-hifas em quadros de infecção mais avançados pela própria invasão aos tecidos por meio dos mecanismos de adesão e secreção de enzimas hidrolíticas.<sup>26</sup>

As leveduras são células ovais ou redondas, unicelulares e que podem se reproduzir por cissiparidade, gemulação ou brotamento formando nesse caso os blastoconídios, associadas ao início da adesão e formação do biofilme. As pseudo-hifas fazem parte de uma transição entre os blastoconídios e hifas verdadeiras, originadas a partir do brotamento ou gemulação de um blastoconídio, permanecendo conectada a essa por meio de constrições. Já as hifas verdadeiras são células alongadas multicelulares que podem ou não formar septos, podendo invadir tecidos e perpetuar a infecção.<sup>25, 27</sup>

A produção de tubo germinativo, uma projeção alongada derivada da levedura, é comumente encontrada em pacientes que utilizam prótese dentária e possuem associado a isso quadros de estomatite protética. Pinto *et al.* analisando a formação do tubo germinativo em 140 indivíduos portadores de prótese dentária maxilar, observaram que das 169 cepas de *C. albicans* isoladas, a maior frequência de produção dessas estruturas dava-se no grupo dos pacientes com estomatite protética.<sup>28</sup> Um resultado semelhante foi obtido na pesquisa de Pereira *et al.* onde a formação dos tubos foi significativamente diferente entre isolados de pacientes com estomatite e os indivíduos do grupo controle.<sup>29</sup>

A prótese dentária constituída em sua maioria por poli (metacrilato de metila) - PMMA é um dos ambientes mais propícios para a adesão de células de *C. albicans* e outras espécies não *albicans*. Aguayo *et al.* avaliando a adesão de células de *C. albicans* em PMMA por meio da microscopia de força atômica (AFM)

observaram que o grau de adesão é dependente da morfologia da cepa, nesse caso, as células em forma de hifas apresentaram uma adesão maior quando comparadas às leveduras.<sup>24</sup>

Fatores de transcrição estão relacionados à morfogênese e são controlados por uma série de sinais como a presença de soro, uso de mutantes defeituosos em genes ligados à reguladores da formação de hifas, hipóxia, baixa quantidade de nitrogênio, radiação UV, além de proteínas semelhantes a integrinas, Hsp90, entre outros.<sup>30-32</sup> Esses fatores são dependentes da via de sinalização CAMP-proteína quinase A (PKA) que regula a morfogênese em *C. albicans*.

A expressão de proteínas semelhantes à aglutinina (Als), em especial a als3 que está presente na adesão é ativada durante o desenvolvimento de hifas em *C. albicans* sendo regulados por fatores de transcrição como *EFG1*, *TEC1* e *BCR1*. Outros genes como *HGC1*, *UME6*, *HWP1* e *ECE1* também foram associados à morfogênese.<sup>33</sup>

Alguns fitoconstituintes podem reduzir a capacidade de filamentação de *C. albicans* pela inibição dessas vias reguladoras. Hsu *et al.* utilizando o linalol para avaliar sua ação no biofilme de *C. albicans*, observaram uma forte supressão de Hwp1 e Als3, componentes da via cAMP-PKA. Ume6, Hgc1 e Eed1 responsáveis pela manutenção das hifas também foram suprimidos.<sup>34</sup> Em um outro estudo utilizando a sanguinarina, houve inibição da formação de hifas pela supressão dos genes *ALS3*, *HWP1*, *ECE1*, *HGC1* e *CYR1* bem como uma queda no nível de cAMP endógeno de *C. albicans*.<sup>35</sup>

Estudos utilizando diferentes compostos como piperina, própolis, loureirina A, alizarina (1,2-di-hidroxiantraquinona), crisazina (1,8-di-hidroxiantraquinona) e purpurina foram capazes de suprimir a formação de tubos germinativos e a transição hifal em *C. albicans*.<sup>36-40</sup> Estudos na literatura com o uso do mirtenol na morfogênese são escassos.

### 2.2.2 Formação de biofilme

O biofilme é definido como uma comunidade de microrganismos que encontram-se aderidos em superfícies e envoltos por uma matriz extracelular que lhe confere estabilidade, nutrição e proteção contra ação de agentes externos.<sup>41</sup> Esse é um importante fator de virulência necessário para que os fungos permaneçam onde estão inseridos e iniciem o processo de invasão tecidual.

A formação do biofilme é comumente descrita em quatro etapas que se inicia pela adesão desses microrganismos sob a forma de levedura às superfícies a partir de interações físico-químicas e expressão de adesinas como os membros da família de genes *ALS* (*ALS3* e *ALS1*), como também os genes *EAP1* e *HWP1*.<sup>42</sup> Farkash *et al.* ao utilizarem polifenóis do chá verde extraído da *Camellia sinensis* e Padma Hepaten mostraram uma forte redução na expressão de adesinas *HWP1*, *EAP1* e *ALS3*, incidindo diretamente na inibição da formação do biofilme de *C. albicans*, o que evidencia a presença desses genes na regulação do biofilme.<sup>43</sup>

Na fase seguinte ocorre à multiplicação e formação de microcolônias pelo processo de filamentação e desenvolvimento de hifas e pseudo-hifas, essas também expressam diferentes genes como *HWP1*, *HWP2*, *RBT1*, *ALS3*, *ALS10*, *FAV2* e *PGA55* além de enzimas que regulam a invasão tecidual como *AP4*, *SAP5* e *SAP6*.<sup>44,45</sup> Na etapa posterior, esses microrganismos ficam envoltos em uma matriz polissacarídica produzida, que é essencial na nutrição, estruturação e proteção do biofilme.

A matriz polissacarídica é constituída por um conjunto de glicoproteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos.<sup>45</sup> Martins *et al.* ao avaliarem a presença e quantidade de DNA extracelular (eDNA) na matriz do biofilme, observaram que havia abundância desse componente e que a adição de DNA exógeno em biofilmes de *C. albicans* acarretava o aumento da biomassa desse biofilme.<sup>46</sup> No entanto, o tratamento com DNase mostrou redução da biomassa em momentos posteriores a sua formação, indicando que o eDNA participa efetivamente na estruturação do biofilme formado.

O biofilme maduro é composto por um conjunto de células de blastoconídeos, pseudo-hifas e hifas verdadeiras que podem colonizar diferentes sítios desde dispositivos médicos como cateteres, marca passos, válvulas cardíacas até superfícies na cavidade bucal como dentes, implantes, língua, próteses dentárias e até canais radiculares.<sup>47, 48, 49</sup> Na dispersão, essas leveduras podem colonizar regiões com o intuito de iniciar um novo processo de colonização, gerando, por conseguinte quadros mais graves de infecção como a candidemia.<sup>50</sup>

A candidemia é caracterizada pela presença de cepas fúngicas na corrente sanguínea, tornando-se uma das causas mais comuns de morte por micose no mundo.<sup>51</sup> No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde a taxa de incidência é de 2.49 casos de candidemia para 1000 admissões hospitalares, o que chega a ser 2 a 15 vezes maior do que as taxas encontradas nos Estados Unidos e na Europa. Dentre os fatores citados para tais dados encontram-se as discrepâncias no padrão de atenção ao paciente e nas terapias adotadas.<sup>52</sup>

A capacidade de formar biofilme é o fator chave no desenvolvimento dos quadros de candidemia, principalmente persistente após o tratamento com antifúngicos.<sup>51</sup> Um estudo realizado no Sul de Taiwan, no Kaohsiung Chang Gung Memorial Hospital, avaliou a formação de biofilme em 136 pacientes com e sem candidemia persistente, mostrando que em cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *N. glabratus* (*C. glabrata*) o desenvolvimento do biofilme foi significativamente maior que no controle.<sup>53</sup>

Um estudo de coorte analisou a correlação entre a capacidade de formar biofilme na corrente sanguínea por isolados de *Candida* e a persistência da infecção em pacientes com candidemia resistente e candidemia única. Os resultados mostraram que *C. albicans* e *C. dubliniensis* produziram mais biofilme no grupo da candidemia resistente.<sup>54</sup>

A maioria dessas infecções têm caráter polimicrobiano, uma vez que *C. albicans* estabelece relações com outras espécies do mesmo gênero e inclusive com bactérias, a exemplo do *Staphylococcus aureus*.<sup>45,55</sup> Esse processo de interação também envolve a regulação e expressão de adesinas como Als1p,

Als2p, Als3p e Hwp1p por *C. albicans* que são utilizadas por bactérias para se aderirem diretamente às hifas.<sup>56, 57</sup>

Na cavidade bucal, *Streptococcus mutans* e *C. albicans* estabelecem relação de sinergismo em lesões cariosas. Um estudo *in vitro* e *in vivo* revelou que *S. mutans* e *C. albicans* aumentaram a produção de matriz extracelular criando biofilmes maiores, aumentando dessa forma a virulência de ambos os microrganismos o que *in vivo* foi evidenciado na formação de lesões de cárie nos roedores.<sup>58</sup> Essa simbiose entre os microrganismos que culmina em um biofilme mais espesso corrobora para uma maior resistência às terapias antifúngicas.

### 2.2.3 Enzimas hidrolíticas: fosfolipase, proteinase, hemolisinas, lipase e DNase

Além da transição de forma de levedura para hifa e formação de biofilme, um outro fator de virulência associado à patogênese da candidíase é a secreção de enzimas hidrolíticas. Fosfolipase, proteinase e hemolisinas são as principais enzimas responsáveis pela aquisição de nutrientes e invasão de *Candida* à célula do hospedeiro.<sup>6, 27</sup>

As fosfolipases são enzimas associadas à lise de fosfolipídios presentes em membranas celulares, sendo classificadas de 4 formas diferentes quanto ao tipo de ligação de éster que fragmentam (A, B, C e D) e podendo estar associados à expressão de genes como *PLB1*, *PLB2*, *PLC1* ou *PLD1*.<sup>6, 32</sup> Essas enzimas são amplamente encontradas em lesões de candidíase nas formas oral, vaginal e cutânea.<sup>59-61</sup>

Uma revisão sistemática e meta-análise sobre a virulência de *C. albicans* na cavidade oral de pacientes infectados pelo HIV em comparação com pacientes não infectados demonstrou que a produção de enzimas hidrolíticas como fosfolipase e hemolisinas foi maior nos pacientes infectados pelo vírus, enquanto que os níveis de protease não.<sup>62</sup> Silva-Rocha e colaboradores ao analisarem a virulência de *C. albicans* isoladas da cavidade oral de 154 transplantados renais em duas regiões diferentes do Brasil, Natal (RN) e Maringá (PR), notaram que

todas as cepas foram capazes de produzir a enzima fosfolipase tanto na fase de colonização quanto de infecção. <sup>63</sup>

Outro estudo dirigido por esses autores utilizando o extrato da *Eugenia uniflora* em 48 cepas de *C. albicans* isolados da cavidade oral de pacientes transplantados renais e 2 de referência (ATCC90028 e SC5314) mostrou que na presença do extrato a atividade da fosfolipase foi completamente inibida, já na avaliação da proteinase, 48 dos 50 isolados foram inibidas, restando apenas 2 cepas que secretaram uma baixa quantidade da enzima. <sup>64</sup> Nciki *et al.* ao utilizarem as folhas de *Mezoneuron benthamianum* observaram que em uma concentração de 200µg/mL ou acima reduziu significativamente a produção de fosfolipase de *C. albicans*, no entanto, na secreção de protease o extrato não teve efeito. <sup>65</sup>

As aspartil proteinases secretoras (SAPS) possuem uma família contendo 10 membros ou genes (*SAP1-10*) podendo ser secretadas por *C. albicans* ou permanecerem aderidos à parede celular do fungo. <sup>66</sup> A virulência de *C. albicans* está relacionada a uma maior atividade dessas enzimas, evidenciado em infecções orais e vaginais que exibem altos níveis de proteínases em comparação a pacientes assintomáticos.

Um estudo *in vitro* conduzido por Gharaghani *et al.* com cento e três isolados de *C. albicans* advindos de pacientes com candidíase vulvovaginal identificou uma produção de proteinase de 97,1%. <sup>59</sup> Essa mesma atividade enzimática foi mostrada por meio de experimento *in vitro* em pacientes com estomatite protética, sendo significativamente maior no grupo doente e correlacionada com a expressão de SAP, sendo a Sap8 produzida em maior quantidade. <sup>67</sup>

Dubois *et al.* em estudo *in vitro* avaliaram a produção enzimática por *C. albicans* e *C. dubliniensis* em pacientes periodontais com HIV recebendo ou não o tratamento antirretroviral a partir de 33 amostras de bolsa periodontal e 6 de mucosa oral. <sup>68</sup> Das 25 cepas de *C. albicans* isoladas foi observado uma alta produção de proteinase nos pacientes que não receberam o tratamento, correspondendo a 81,8% comparado ao grupo que recebeu (33,3%). Já a

produção de fosfolipase foi de 100% nas cepas isoladas de *C. albicans* não tratadas.

As hemolisinas também integram o grupo das enzimas hidrolíticas sendo amplamente secretadas por *C. albicans* em quadros de candidíase esofágica, vulvovaginal, trato respiratório, urinário e na cavidade oral.<sup>68-70</sup> Um estudo transversal conduzido por Jafarian *et al.* ao avaliar a atividade enzimática de cepas de *Candida* spp. em vinte e três amostras de biópsia esofágica com diagnóstico de candidíase, revelou que 82,6% dos isolados (19 cepas) pertenciam a espécie *C. albicans* e destes 68,4% possuíam atividade muito forte de hemolisinas, 47,4% de fosfolipase e 36,8% de proteinase.<sup>69</sup>

Outras enzimas descritas na literatura e que são associadas com virulência de *C. albicans* são as lipases e o DNase. As lipases compõem uma família de proteínas codificadas por 10 genes (*LIP1-LIP10*) e participam ativamente no processo de invasão à célula do hospedeiro pela degradação lipídica da membrana plasmática, além de lesar células relacionadas ao sistema de defesa do corpo humano.<sup>71,72</sup> Trofa e colaboradores estudando a ação de lipases em modelo murino de candidíase neonatal ocasionada por *C. albicans* e *C. parapsilosis*, observaram que o uso de mutantes com ausência desta enzima gerou menor virulência e invasão nos órgãos dos afetados.<sup>73</sup>

Quanto à DNase, alguns estudos relacionam a capacidade de *C. albicans* de secretá-la ao dano na estrutura do DNA dos neutrófilos, produtores de armadilhas extracelulares que tem a capacidade de danificar diversos fatores de virulência, colaborando assim na sua sobrevivência e manutenção da sua patogenicidade.<sup>74</sup>

## **2.3 Resistência aos medicamentos antifúngicos**

Apesar dos avanços da indústria farmacêutica na formulação de novos medicamentos para as mais variadas desordens sistêmicas do corpo humano, o tratamento para quadros de candidíase ainda se restringe a disponibilidade de três classes de antifúngicos: azóis, equinocandinas e polienos. Associado a isso,

uma crescente resistência a esses medicamentos, seja por falha no diagnóstico e tratamento e mais intrinsecamente por mutações genéticas, fatores de transcrição, aumento do efluxo de drogas e expressão de fatores de virulência têm colaborado para maiores taxas de mortalidade pela doença. <sup>75-77</sup>

A diminuição da susceptibilidade antifúngica por espécies de *C. albicans* tem sido amplamente relatada na literatura. Um estudo observacional prospectivo realizado durante 5 anos em um hospital universitário no sul da Tailândia analisando 133 isolados de *Candida* spp. invasivos demonstrou a presença das seguintes espécies: *C. tropicalis* (39,1%), *C. albicans* (24,8%), *C. parapsilosis* (20,3%), *N. glabratus* (*C. glabrata*) (10,5%) e *Candida* spp (5,2%). Dentre essas espécies havia uma susceptibilidade reduzida de *C. tropicalis* e *N. glabratus* (*C. glabrata*) à equinocandina e aos triazóis utilizados. *C. albicans* e *C. tropicalis* apresentaram maiores MIC's e diminuição da susceptibilidade a todos os azóis testados. <sup>78</sup>

Um estudo conduzido por Monroy-Pérez e outros autores identificou que todas as 80 cepas de *C. albicans* isoladas de pacientes com doença periodontal apresentavam fenótipo de resistência a azóis como cetoconazol e fluconazol, mas susceptíveis à nistatina. <sup>79</sup> Ademais, 9 cepas isoladas do grupo saudável também foram resistentes a esses medicamentos. Quanto aos genes responsáveis pela expressão dos fatores de virulência analisados (adesão, lipases e fosfolipases), no grupo com periodontite moderada os genes mostraram ter maior atividade comparado ao grupo da periodontite crônica e gengivite.

No entanto, uma revisão sistemática e de meta-análise sobre perfis de resistência a agentes antifúngicos em *C. albicans* isolados da cavidade oral mostraram que a maioria dos medicamentos que estão disponíveis para o tratamento da candidíase é eficaz e que pacientes que apresentavam várias alterações de saúde eram mais sujeitos a resistência dos medicamentos. <sup>80</sup>

Uma segunda revisão sistemática sobre a resistência antifúngica de 6322 isolados clínicos de *C. albicans* no Irã realizada por Kermani *et al.* destacou maior resistência de cepas isoladas vulvovaginais e orofaríngeas ao clotrimazol e uma tendência na resistência à anfotericina B, bem como a medicamentos do grupo

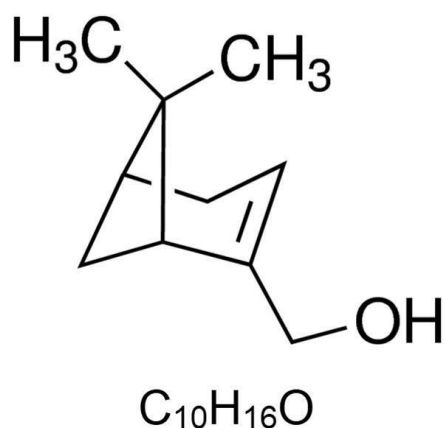
das equinocandinas como a caspofungina (4,53%). Nesse estudo ainda, a resistência à 5-flucitosina subiu de 10,56% para 42,01%.<sup>81</sup>

Nesse contexto, a literatura é unânime quanto ao controle na dispensação e uso de antifúngicos, podendo ser considerado em casos de resistência uma combinação desses medicamentos de acordo com cada caso.<sup>80,81</sup> Outrossim, faz-se necessário a pesquisa e incorporação de novos medicamentos a partir de fitoconstituintes para ampliar o arsenal de medicamentos e atuar de forma eficaz no tratamento da candidíase.

## **2.4 Ação do mirtenol em *Candida albicans***

A pesquisa científica sobre novos agentes terapêuticos derivados de plantas têm corroborado na identificação de princípios ativos fundamentais no tratamento de diferentes doenças.<sup>82</sup> No Brasil onde se concentra a maior biodiversidade com o registro de 45.000 espécies o que representam 20-22% do que existe no mundo todo o que conduz a um potencial na formulação de novos medicamentos.<sup>83</sup>

Entre os diversos compostos identificados e analisados ao longo dos anos, destaca-se o mirtenol (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O) (figura 1), um monoterpene e princípio ativo da planta *Myrtus communis*, conhecida como "murta verdadeira" ou "murta comum", que pertence à família Myrtaceae. Esse composto também pode ser encontrado em outras espécies, como o *Tanacetum vulgare*. O mirtenol é originário da Europa e é amplamente distribuído no Sul do Brasil.<sup>84, 85</sup> É bem descrita na literatura pelas suas propriedades anti inflamatória, antioxidante, cicatrizadora, cardioprotetora e antinociceptiva.<sup>12, 86, 87</sup>



**Figura 1** – Estrutura química do mirtenol (Huang, *et al.* 2021)

Existem poucos estudos na literatura sobre a ação do mirtenol contra cepas de *C. albicans*. Um estudo apontou o caráter antifúngico do (-)-mirtenol contra cepas de *C. albicans* e *C. parapsilosis* em uma concentração inibitória mínima de 256 µg/mL a 512 µg/mL e o mesmo apresentou ação fungicida.<sup>88</sup>

Mahmoud *et al.* realizando um estudo *in vitro* mostraram que dois isômeros ópticos, (-)-mirtenol e (+)-mirtenol apresentaram aumento da atividade antimicrobiana e de prevenção de biofilme de drogas convencionais (amicacina, fluconazol e cloreto de benzalcônio) contra *S. aureus* e *C. albicans*.<sup>89</sup>

Já uma análise da composição qualitativa e quantitativa do óleo volátil derivado da planta *Tanacetum vulgare*, identificou a presença de substâncias como 1,8-cineol, trans-tujona, cis-crisantenol, borneol e mirtenol apresentando atividade antifúngica de amplo espectro para leveduras, dermatófitos e cepas de *Aspergillus*. Em *C. albicans* com uma CIM de 1,25 µg/mL houve inibição significativa na formação do tubo germinativo. Em uma concentração de 0,08 µg/mL teve-se uma redução da filamentação superior a 80%.<sup>90</sup>

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar a ação *in vitro* do (-)-mirtenol nos fatores de virulência em cepas de *Candida albicans* isolados da mucosa oral.

#### 3.2 Objetivos específicos

- a) Determinar a concentração inibitória mínima do (-)-mirtenol;
- b) Observar a transição de blastoconídios para hifas verdadeiras (morfogênese) em *C. albicans* na presença do (-)-mirtenol;
- c) Verificar o comprimento das hifas após indução da morfogênese na presença do (-)-mirtenol;
- d) Analisar a morfogênese por cepas de *C. albicans* em meio de cultura sólido na presença do composto;
- e) Averiguar a atividade da enzima hidrolítica lipase na presença de (-)-mirtenol;
- f) Analisar a formação de biofilme por cepas de *C. albicans* isolados da cavidade oral na presença do composto.

#### **4. ARTIGO**

O manuscrito a seguir foi submetido para publicação no periódico “Medical Mycology” ISSN: 1460-2709/ Qualis Capes Odontologia A1 e encontra-se em análise.

# IN VITRO ACTIVITY OF (-)-MYRTENOL ON VIRULENCE FACTORS OF *Candida albicans* ISOLATED FROM THE ORAL CAVITY

## Effect of (-)-Myrtenol on Virulence Factors of *Candida albicans*

Authors: Camila Mendes Soares<sup>1</sup>, Larissa Alves da Silva<sup>1</sup>, Luanna de Oliveira e Lima<sup>1</sup>, José Maria Barbosa Filho<sup>2</sup>, Felipe Queiroga Sarmiento Guerra<sup>3</sup>, Guilherme Maranhão Chaves<sup>4</sup>, Walicyranison Plínio da Silva Rocha<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Master's student, Clinical Mycology Laboratory, Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, Brazil.

<sup>2</sup> PhD, Pharmaceutical Technology Laboratory, Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, Brazil.

<sup>3</sup> PhD, Clinical Mycology Laboratory, Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, Brazil.

<sup>4</sup>PhD, Laboratory of Medical and Molecular Mycology, Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Rio Grande do Norte.

Camila Mendes Soares: <https://orcid.org/0000-0001-7171-9504>

Larissa Alves da Silva: <https://orcid.org/0000-0001-5073-7033>

Luanna de Oliveira e Lima: <https://orcid.org/0000-0002-9479-1733>

José Maria Barbosa Filho: <https://orcid.org/0000-0002-9567-4096>

Felipe Queiroga Sarmiento Guerra: <https://orcid.org/00000003-2057-4821>.

Guilherme Maranhão Chaves: <https://orcid.org/0000-0002-0170-9383>

Walicyranison Plínio da Silva Rocha: <https://orcid.org/0000-0003-0639-2781>

Author for correspondence: Walicyranison Plínio da Silva-Rocha.

Federal University of Paraíba, Department of Pharmaceutical Sciences, Clinical Mycology Laboratory. Campus I - University City Subdivision. Zip Code: 58051-900 - João Pessoa, Paraíba.

Email: [wps@academico.ufpb.br](mailto:wps@academico.ufpb.br)

Phone: (55) (83) 99985-7721

## ABSTRACT

*Candida albicans* is a yeast commonly found in the oral cavity, gastrointestinal tract, and vaginal mucosa. This species is the most virulent and prevalent in conditions such as oral candidiasis. Immunosuppressive conditions, combined with the species virulence factors, contribute to the establishment and persistence of the infection. Although numerous studies have investigated bioactive compounds with antifungal properties, few have assessed their impact on virulence factors. This study aims to evaluate the effect of (-)-myrtenol on the virulence factors of *Candida albicans*. Fourteen *C. albicans* strains were used, including thirteen isolated from the oral mucosa of patients with oral candidiasis and one reference strain (ATCC 90028). The virulence factors examined included morphogenesis, lipase production, and biofilm formation. All assays were conducted in the presence and absence of (-)-myrtenol, using a minimum inhibitory concentration (MIC) of 256 µg/mL. The compound was observed to delay germ tube formation, reduce filamentation in liquid and solid media, and reduce biofilm formation. Additionally, (-)-myrtenol inhibited lipase activity. The virulence factors expressed by *C. albicans* contribute to increased infection rates and, consequently, higher morbidity and mortality. Coupled with the rising prevalence of antifungal-resistant strains, this underscores the urgent need for new therapeutic options. Given the limited therapeutic alternatives for fungal infections, (-)-myrtenol emerges as a compound with significant potential for treating candidiasis.

Keywords: *Candida albicans*, opportunistic infections, pathogenicity, phytochemicals, myrtenol

## LAY ABSTRACT

*Candida albicans* can cause infections like oral candidiasis. This study found that (-)-myrtenol reduces filamentation, biofilm formation, and enzyme production in *Candida albicans*. With rising drug resistance, (-)-myrtenol shows promise as an alternative antifungal treatment.

## 1. INTRODUCTION

The oral cavity is an environment inhabited by a variety of microorganisms, including viruses, fungi, protozoa, and bacteria, which colonize structures such as teeth, tongue, gingival sulcus, mucous membranes, and oropharynx<sup>1,2</sup>. In healthy individuals, yeasts of the genus *Candida* can colonize without causing harm to the host. However, under favorable conditions, these fungi can proliferate and invade adjacent tissues, leading to oral candidiasis, an opportunistic fungal infection<sup>3</sup>.

Among the species of the genus *Candida*, *C. albicans* Complex is considered the most prevalent, being isolated in approximately 80% of cases. However, other species such as *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* Complex, *Nakaseomyces glabratus* and *Pichia kudriavzevii* can also be identified<sup>3,4,5</sup>. Systemic factors related to immunosuppression, malignant hematological diseases, prolonged use of antibiotics and corticosteroids, as well as local factors such as loss of vertical occlusion dimension in edentulous or partially edentulous patients, hyposalivation, poorly maintained dental prostheses, and epithelial dysplasias can contribute to the development of oral candidiasis<sup>5,6,7</sup>.

Clinically, oral candidiasis can present in various forms, with pseudomembranous candidiasis being the most recognized<sup>8</sup>. Other factors to consider in the onset and progression of this disease, including its more severe forms such as candidemia, are the expression of virulence factors present in the strain, in addition to the host's immunocompromised state.

*Candida albicans* exhibits polymorphism, meaning it can display three distinct morphologies: blastoconidia, true hyphae, and pseudohyphae<sup>9</sup>. This attribute, known as morphogenesis, facilitates tissue invasion by the fungus, promoting greater local damage and, depending on the patient's condition, potentially favoring dissemination through the bloodstream<sup>10</sup>. Additionally, biofilm formation and the secretion of hydrolytic enzymes, such as lipases, increase the fungus's invasive capacity.<sup>11,12,13</sup>.

Despite advances in the pharmaceutical industry in developing new medications for various systemic disorders, treatment for candidiasis remains limited to the availability of the main classes of antifungals: azoles, echinocandins, and polyenes. The growing resistance to these medications highlights the need for new active compounds, such as natural products and their derivatives, to expand the therapeutic arsenal.

Scientific research on new therapeutic agents derived from natural products has gained increasing momentum in recent years<sup>14</sup>. Among the numerous compounds identified and analyzed across various studies, myrtenol (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O), a monoterpene primarily found in the species *Myrtus communis* (commonly known as "true myrtle" or "common myrtle"), is well-documented in the literature for its anti-inflammatory, antioxidant, wound healing, cardioprotective, and antinociceptive properties<sup>15,16,17</sup>.

Given this context, the present study evaluated the effects of (-)-myrtenol on the virulence factors of *C. albicans* isolated from patients with oral candidiasis, including adhesion to oral epithelial cells, morphogenesis, biofilm formation, and lipase enzyme secretion.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 STUDY DESIGN**

This study is an *in vitro* experimental laboratory investigation conducted at the Clinical Mycology Laboratory, Department of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba.

Fourteen strains of *C. albicans* were used in this study, including thirteen strains collected from the oral mucosa of patients with oral candidiasis and one reference strain (*C. albicans* ATCC 90028). These strains were obtained from the oral cavities of kidney transplant recipients, following approval by the research ethics committee (approval number 23611519.6.0000.5292), and are stored in the yeast bank of the study laboratory.

### **2.2 VIABILITY AND SAMPLES PURITY**

The strains were reactivated in liquid YPD medium ("Yeast Peptone Dextrose"; yeast extract 10g/L; dextrose 20g/L; peptone 20g/L) and incubated at 37°C for 48 hours. Subsequently, they were inoculated onto Sabouraud Dextrose Agar and incubated at 37°C for 48 hours.

To assess purity, yeasts were inoculated into Petri dishes (90x15mm) containing CHROMagar *Candida*® medium (CHROMagar™ *Candida*, Difco, USA), a selective chromogenic medium that allows the identification of mixed

yeast cultures. The plates were incubated at 37°C for 48 hours, with positivity for *C. albicans* indicated by green-colored colonies. In addition, the strains were previously subjected to microsatellite typing PCR and ABC genotyping, as described by da Silva-Rocha *et al.*<sup>18</sup>

### **2.3 (-)-MYRTENOL COMPOUND**

The (-)-myrtenol used in the experiments was purchased from Sigma-Aldrich®, São Paulo, SP, Brazil (lot #BCBM4384V), and was kindly provided by Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho, a senior professor in the Department of Pharmaceutical Sciences at the Federal University of Paraíba.

### **2.4 MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION ASSAY**

The minimum inhibitory concentration (MIC) of (-)-myrtenol was determined using the microdilution technique in 96-well U-bottom microplates (ALAMAR®), as described by the Clinical and Laboratory Standards Institute<sup>19,20</sup>, with some modifications. Yeast suspensions were prepared in RPMI 1640 broth with glutamine and without sorbitol (Roswell Park Memorial Institute) and adjusted to a turbidity equivalent to  $2.5 \times 10^3$  CFU/mL. Serial dilutions of the test substances were made in U-bottom 96-well microtitration plates containing sterile RPMI, in triplicate. The plates were incubated at 35°C for 24 hours, and the results were read by visual observation of cell aggregates at the bottom of the wells. The

(-)-myrtenol emulsion was prepared using 5% DMSO and 2% Tween 80, with test concentrations ranging from 1024 to 8 µg/mL.

Controls for microbial viability, medium sterility, and the solvents used in the preparation of the compound were also conducted. All assays were performed in triplicate. The plates were then incubated at 35°C for 24 hours. After this period, the results were read visually. The MIC was defined as the lowest concentration of the compound capable of visibly inhibiting fungal growth. The result was expressed as the arithmetic mean of the MICs obtained from the three assays.

## **2.5 INOCULUM STANDARDIZATION**

To phenotypically characterize the isolated *C. albicans* strains, the samples were grown in liquid YPD medium in the presence and absence of (-)-myrtenol (256 µg/mL- Minimum Inhibitory Concentration previously determined). Cells were inoculated by wet looping into the medium (using a loop loaded with a film of yeast suspension, which was quickly immersed in the medium and then removed) and incubated for 18-24 hours at 37°C.

Subsequently, the cultures were measured using spectrophotometry (optical density = 600nm), with absorbance values ranging from 0.8 to 1.2 (this procedure yielded an inoculum of approximately  $2 \times 10^8$  cells/mL). *C. albicans* cells were then diluted to achieve the required inoculum concentration for each virulence attribute assessed. Thus, for comparative purposes, all subsequent experiments were conducted both in the absence and presence of the substance being tested.

## 2.6 MORPHOGENESIS ASSAY

The morphogenesis assay was performed according to the technique described by Chaves *et al*<sup>21</sup> with few modifications. The *C. albicans* cells were grown overnight (18 to 24 hours) in YPD medium in the presence and absence of (-)-myrtenol. The absorbance of cellular growth was measured using spectrophotometry (600 nm), and the concentration was standardized to  $1 \times 10^6$  cells/mL.

To induce morphogenesis, 30  $\mu$ L of the standardized growth was inoculated into YPD broth supplemented with 20% Fetal Bovine Serum (FBS) (4 mL of liquid YPD, 1 mL of FBS) in tubes and incubated at 37°C for 1 hour, followed by an additional 2 hours, totaling 3 hours of incubation.

At the end of the 1-hour period, a 500  $\mu$ L aliquot of the suspension was added to 2 mL Eppendorf tubes containing 500  $\mu$ L of 10% formalin for subsequent microscopic examination. The tubes containing the inocula were then incubated again to complete the 3-hour incubation period. After this period, a 500  $\mu$ L aliquot was transferred to Eppendorf tubes containing 500  $\mu$ L of 10% formalin and stored at 4°C for later microscopic observation.

All slides were read in triplicate. The slides from the 1-hour incubation were evaluated by counting 100 cells per slide and determining the percentage of cells that exhibited germ tube formation.

Regarding the slides from the samples subjected to 3 hours of incubation, the Morphology Index was calculated, as greater morphological variability of *C. albicans* cells is expected. Therefore, 100 *C. albicans* cells were counted on each slide, with the following morphology classifications: blastoconidia (round cells) were assigned an MI value of 1; elongated cells with a diameter twice the length were assigned MI = 2; cells resembling pseudohyphae were assigned MI = 3; and long, true hyphae with parallel sides were assigned MI = 4. The Morphology Index (MI) was determined using the following formula:

$$\text{Morphology Index (MI)} = \frac{(\text{N}^\circ \text{MI1} \times 1) + (\text{N}^\circ \text{MI2} \times 2) + (\text{N}^\circ \text{MI3} \times 3) + (\text{N}^\circ \text{MI4} \times 4)}{100}$$

In this context, values close to one indicate a population of spherical yeast cells; values close to four indicate a population of true hyphae; and values between one and four suggest the presence of varied morphologies or, predominantly, pseudohyphae.

## **2.7 MEASUREMENT OF *Candida albicans* HYPHAL LENGTH**

The cell length of *C. albicans*, specifically strain 97, was measured after the induction of morphogenesis (incubation for 3 hours in YPD + 20% FBS). The NIS-Elements D software was used for this purpose. For each strain, the average length of 100 hyphal cells was determined for isolates previously cultured in the presence or absence of (-)-myrtenol.

## 2.8 MORPHOGENESIS OF *Candida albicans* ON SOLID MEDIA

To induce hyphal formation on solid medium, cells were cultured in YPD. A 10  $\mu$ L aliquot of the standardized cell suspensions was inoculated onto the surface of Spider medium (nutrient agar 10 g, mannitol 10 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g, agar 14.5 g, distilled water 1000 mL) <sup>22</sup> in the presence and absence of (-)-myrtenol. The plates were incubated at 30°C for seven days, after which the macromorphological aspects of the colonies were observed. The assay was performed in triplicate.

## 2.9 LIPASE ENZYME PRODUCTION

Lipase zone (LZ) was assessed using the methodology proposed by Mushin *et al.*<sup>23</sup>, with some modifications. Initially, cultures grown overnight in YPD broth with and without (-)-myrtenol were diluted and standardized to a concentration of  $2 \times 10^5$  cells/mL.

Subsequently, 10  $\mu$ L of each strain suspension was cultivated on sterile Petri dishes containing lipid medium (peptone 1%, sodium chloride 5%, calcium chloride 0.01%, and agar 2%, plus 1% Tween 80) and incubated at 32°C for 5 days. After the incubation period, the diameters of the colonies and the halos formed were measured. LZ was determined using the following equation:

$$\text{LZ} = \frac{\text{Colony diameter (cm)}}{2}$$

$$\text{LZ} = \frac{\text{Colony diameter (cm)} + \text{Precipitation zone (cm)}}{2}$$

An LZ of 0 – 0.33 was considered strong, an LZ of 0.34 – 0.66 was considered moderate, an LZ of 0.67 – 0.99 was considered weak, and an LZ of 1 indicated no lipase activity

## **2.10 BIOFILM FORMATION ASSAY**

To promote biofilm formation, *C. albicans*<sup>24</sup> cells were cultured on Sabouraud Dextrose Agar at 37°C for 18 hours. The isolates were then inoculated into 5 mL of YPD medium and incubated overnight for 18 hours at 200 rpm, both in the presence and absence of (-)-myrtenol. After incubation, the samples were centrifuged at 5000 rpm for 5 minutes at room temperature, and the resulting pellet was washed twice in 5 mL of PBS (Phosphate Buffered Saline; NaCl 8g/L; KCl 0.2g/L; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24g/L, pH 7.2) under the same centrifugation conditions. The cell pellet was then resuspended in 5 mL of PBS and the cell concentration was adjusted to 10<sup>7</sup> cells/mL with an optical density of 0.38 at 520 nm.

For the adhesion phase, *C. albicans* cell suspension was transferred to sterile 96-well microtiter plates. A total of 100 µL of the suspension was added to each well and incubated for 1.5 hours at 37°C with mechanical agitation at 75 rpm. After the adhesion phase, the non-adherent cell suspension was removed, and the wells were washed twice with 150 µL of PBS. Following this, 100 µL of supplemented YPD medium was added to each well, and the plate was incubated for 66 hours at 37°C with agitation at 75 rpm. Biofilm quantification was performed using crystal violet staining.

After biofilm formation, the YNB medium was removed, and each well was washed twice with 150  $\mu$ L of PBS. The plate was then left at room temperature for 45 minutes to dry. Next, 110  $\mu$ L of a 0.4% aqueous crystal violet solution was added to each well and incubated for 45 minutes. Subsequently, the wells were washed three times with sterile ultrapure water, and 200  $\mu$ L of 95% ethanol was added to each well, with incubation for 45 minutes. After this period, 100  $\mu$ L of the decolorizing solution was transferred to a new sterile plate, and quantification was performed using a microplate reader with a filter at 570 nm.

## **2.11 STATISTICAL ANALYSIS**

The data were analyzed using the statistical software “Jamovi” version 2.5.5. Results were presented as mean  $\pm$  standard deviation, and differences were analyzed using the Independent Samples t-Test. For all analyses, a p-value of 0.05 and a 95% confidence interval were considered.

## **3 RESULTS**

### **3.1 MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION ASSAY**

In this study, the minimum inhibitory concentration determined using the microdilution technique in 96-well U-shaped microplates was 256  $\mu$ g/mL used for all assays.

### 3.2 MORPHOGENESIS ASSAY

The effect of (-)-myrtenol on *C. albicans* filamentation was evaluated using serum and a temperature of 37°C as inducing agents. After 1 hour of incubation, the germ tube formation capacity was evaluated. The overall mean percentage of germ tube formation for the strains evaluated was 52% in the absence of (-)-myrtenol. A reduction was observed in the presence of the compound, with a mean formation rate of 28%. Strain 89 showed the greatest reduction (57% vs. 10%), as described in Figure 1.

After three hours of incubation, the Morphology Index was calculated, since different morphological aspects can be observed after this period. It was observed that in the absence of (-)-myrtenol, pseudohyphae predominated, with a mean MI of 3.10 among the 14 strains evaluated. In the presence of the compound, this decreased to a MI of 2.58.

Strain 97 was highly filamentous, with a MI. of 3.81 predominantly forming long true hyphae. In the presence of (-) myrtenol, the Morphology Index was reduced to 2.83. Strain 90 showed the best result in reducing hyphae formation, with a MI of 3.62 in the absence of (-)-myrtenol and a MI of 1.72 in the presence of the compound (Fig. 2).

### 3.3 MEASUREMENT OF *Candida albicans* HYPHAL LENGTH

After evaluating the results obtained from the morphogenesis phase in liquid medium (3 hours), it was found that strain 97 had a greater filamentation capacity than the other strains. In the presence of the substance, a reduction in its

size was observed. Strain 97 was selected for measurement using an optical microscope and NIS-Elements D software (Eclipse Ci, Nikon, Japan). In the absence of (-)-myrtenol, most of the analyzed hyphae had an overall average size of 92.1 micrometers ( $92.1 \pm 21.34$ ), which decreased to 77.42 micrometers ( $77.42 \pm 17.56$ ) in the presence of (-)-myrtenol this reduction being significant.

### **3.4 MORPHOGENESIS OF *Candida albicans* ON SOLID MEDIA**

Morphogenesis in *C. albicans* was also observed by inducing it on solid medium using Spider medium for 7 days. Strains 89, 97, and 99 exhibited a filamentous phenotype when grown in the medium without (-)-myrtenol. When inoculated onto Spider agar with (-)-myrtenol, the colonies displayed a smooth phenotype. It was observed that the macroscopic appearance of the colonies for most isolates remained smooth both in the presence and absence of the substance (Table 1).

### **3.5 LIPASE ENZYME PRODUCTION**

The effect of (-)-myrtenol on lipase enzyme secretion was investigated across the 14 strains in the study. After the incubation period, the diameters of the colonies and the halos formed were measured, and the Lipase Zone (LZ) was calculated. In the absence of (-)-myrtenol, the isolates exhibited an average LZ of 0.64, indicating moderate activity. Strain 89 displayed the highest activity, while strains 98 and 100 did not secrete lipases. In the presence of (-)-myrtenol, there was complete inhibition of enzymatic activity, as indicated by an average LZ of 1

(Fig. 3). Figure 3 presents the averages as well as the standard deviations for each analyzed strain.

### 3.6 BIOFILM FORMATION ASSAY

The effect of (-)-myrtenol on the inhibition of biofilm formation was investigated in the 14 study strains, with a reduction in biofilm formation observed for most isolates (Fig. 4). The mean biofilm formation was 0.18 in the absence of (-)-myrtenol and decreased to 0.10 in the presence of the compound. Strain 89 exhibited the highest biofilm formation in the absence of (-)-myrtenol ( $0.4 \pm 0$ ), which decreased in the presence of (-)-myrtenol ( $0.2 \pm 0$ ). Strain 97, which was highly filamentous, had biofilm formation completely inhibited in the presence of (-)-myrtenol.

## 4. DISCUSSION

The present study aimed to evaluate the in vitro action of (-)-myrtenol, a compound with documented antifungal activity, on various virulence factors expressed by *Candida albicans*.<sup>25,26</sup> This is the first study to address the use of this monoterpene in the following virulence factors: morphogenesis and hydrolytic enzyme activity and morphogenesis.

Myrtenol is a monoterpene primarily found in a plant commonly known as myrtle (*Myrtus communis*). This plant belongs to the Myrtaceae family and

possesses antimicrobial properties (antibacterial, antifungal, and antiviral), as well as cardioprotective, antioxidant, and anti-inflammatory properties, among others.<sup>27</sup> In addition to *M. communis*, other species within the Myrtaceae family, such as *Eugenia uniflora* (1000 µg/mL) and *Leptospermum scoparium* (20 µg/mL), also exhibit described antifungal activities.<sup>28,29</sup>

When analyzing the morphogenetic process of *Candida albicans*, the results of this study indicate that (-)-myrtenol has a significant effect in inhibiting the phenotypic transition of the strains evaluated. Morphological changes that culminate in the formation of true hyphae are a key factor in virulence, leading to a greater ability to cause infections. Notably, a marked reduction in germ tube formation was observed in all 14 strains evaluated when (-)-myrtenol was applied. The first hour of filamentation induction is the period during which germ tubes are formed, and the action of (-)-myrtenol in delaying this process could potentially reflect in humans as a difficulty for the yeast to advance in the infectious process.

After 3 hours of filamentation induction, the formation of true hyphae is observed. In this study, a reduction in the formation of these structures and a predominance of short pseudohyphae were noted. The clinical isolate 97 used in the study is a strain with a high capacity for hyphae formation (IM 3.81). However, under the action of (-)-myrtenol, the IM was reduced to 2.83. For this same strain, there was a decrease in length when the compound was present. This finding reinforces that even in situations of complex morphology, (-)-myrtenol was able to reduce filamentation.

In a study carried out by Silva-Rocha *et al.*, the action of the crude extract of *Eugenia uniflora*, a terpene, on morphogenesis was evaluated under different

induction conditions similar to this study.<sup>30</sup> They observed that the predominant morphology was that of pseudohyphae, with reduced filamentation after the use of the extract. These results are in line with the data presented in the current study, indicating that (-)-myrtenol acts by delaying or inhibiting the filamentation of *Candida albicans*. The same authors also pointed out a reduction in the length of the hyphae evaluated as well as in the filamentation of colonies on solid spider medium. In the present study, most strains maintained smooth colonies, however strains such as 89, 97 and 99 reduced their filamentation with (-)-myrtenol.

Recent studies have evaluated the use of other terpenes such as carvacrol, limonene, thymol, eugenol, and observed that these compounds were able to reduce *Candida albicans* filamentation at different concentrations.<sup>31-33</sup> This is the first study to report the action of (-)-myrtenol on this specific virulence factor.

Our findings suggest that (-)-myrtenol has potential as a therapeutic agent in candidiasis. The process of morphogenesis significantly contributes to tissue invasion, as the extension of hyphae facilitates tissue erosion and consequently, greater damage to the host. Therefore, since (-)-myrtenol affects the formation of filamentous structures, it may impede the progression of tissue damage during infection.<sup>34</sup>

In a study by Silva-Rocha *et al.* proteomic analysis was used to identify proteins affected during morphogenesis by the ethyl acetate fraction of the crude extract of *Eugenia uniflora*.<sup>35</sup> The findings showed that cell wall proteins directly involved in hyphal elongation had reduced expression. The findings of the present study may, through a similar mechanism, also affect these cell wall proteins, suggesting another potential target of (-)-myrtenol's action.

Several species of the *Candida* genus, such as *C. rugosa*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, and *C. albicans* secrete lipase as a virulence factor<sup>36-38</sup>. This enzyme, due to its ability to lyse lipids, facilitates invasion and colonization of host tissues.<sup>39,40</sup> In this study, (-)-myrtenol robustly inhibited lipase production, as evidenced by the complete absence of lipase production halos.

A study conducted by Prasath *et al.* using palmitic acid to inhibit virulence factors in *Candida tropicalis* reported a significant reduction in lipase production at a concentration of 200 µg/mL after 48 hours of incubation.<sup>41</sup> In *C. albicans*, ten lipases (Lip1-10) have been described, each acting at different stages of the infectious process. Among these, Gácsér *et al.* demonstrated that mutant strains of lipase 8 exhibited reduced virulence in a murine infection model.<sup>42</sup> Therefore, the action of (-)-myrtenol in preventing the secretion of lipases in *C. albicans* may also indicate an important interaction in reducing the virulence of this pathogen.

The ability to form biofilms is a significant virulence factor in the pathogenesis of candidiasis. Biofilms, composed of a matrix of yeast cells, pseudohyphae, and hyphal cells, provide increased protection and resistance to physical and chemical insults, including antifungal agents. This enhances the likelihood of systemic infections due to the release of new cells that act as reservoirs for the infection.<sup>43-45</sup>

The results of this study demonstrate that, despite the low biofilm formation by the evaluated strains, (-)-myrtenol significantly reduced the formation of this structure in most cases. In a recent study, Mahmoud *et al.* explored the optical isomers (-)-myrtenol and (+)-myrtenol, observing that these increased the

efficacy of amikacin and fluconazole in inhibiting biofilm development in half of the isolates of *S. aureus* and *C. albicans*.<sup>24</sup>

Biofilm plays a crucial role in maintaining infection by serving as a reservoir of cells and protecting them from both phagocytic attacks and the action of drugs. Therefore, the ability of (-)-myrtenol to reduce biofilm formation underscores the importance of this compound as a potential therapeutic agent, directly influencing the expression of virulence factors in *Candida albicans*.

## **LIST OF ABBREVIATIONS**

HOEC – Human Oral Epithelial Cells

MI – Morphology Index

LIP – Lipase

LZ – Lipase Zone

MIC – Minimum Inhibitory Concentration

PBS – Phosphate Buffered Saline

SFB – Fetal Bovine Serum

YPD – Yeast Peptone Dextrose

## **POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST**

The authors declare no conflicts of interest.

## **DATA AND MATERIALS AVAILABILITY**

Not applicable.

## **FUNDING**

No funding sources were provided for this study.

## **CREDITS**

Soares, C. M: investigation, manuscript writing, formal analysis. Silva, L. A: investigation. Lima, L. O: investigation. Filho, J. M. B: resources. Guerra, F. Q. S: resources, critical review of the research. Chaves, G. M: resources, methodology.

Silva-Rocha, W. P: conceptualization, methodology, writing – review and editing, formal analysis, supervision.

## REFERENCES

1. Germano, VE, Xavier, CMR, Jales, MMS, Albuquerque, TVG, De Lima, ELF, Ribeiro, LH. Microrganismos habitantes da cavidade oral e sua relação com patologias orais e sistêmicas: revisão de literatura. Rev. Ciênc. Saúde Nova Esperança. 2018; 16; 91-99.
2. Jorge, A. Microbiologia e Imunologia Oral. Grupo GEN Guanabara Koogan, 2012; 1: 218.
3. Almeida, OP. Patologia oral. (Abeno). Artes Médicas. 2016.; 1:43.
4. Taverne-Ghadwal L, Kuhns M, Buhl T, *et al*. Epidemiology and Prevalence of Oral Candidiasis in HIV Patients From Chad in the Post-HAART Era. Front Microbiol. 2022;13:844069.
5. Gupta B, Gupta S, Chaudhary M, Raj AT, Awan KH, Patil S. Oral candida prevalence and species specificity in leprosy. Dis Mon. 2020; 66(7):100920.
6. Pereira FGA, Milagres A, Werneck JT, Marques LC, Picciani BLS, Junior AS. Oral candidiasis in patients with haematological diseases: Diagnosis through clinical and cytopathological examinations. Cytopathology. 2022;33(5):611-617.
7. Mäkinen AI, Mäkitie A, Meurman JH. Candida prevalence in saliva before and after oral cancer treatment. Surgeon. 2021;19(6):446-451.
8. Neville, B. Patologia oral e maxilofacial. Elsevier. 2009; 3:972.
9. Gow NA, van de Veerdonk FL, Brown AJ, Netea MG. Candida *albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. Nat Rev Microbiol. 2011;10(2):112-122.
10. Mayer, François L *et al*. "Candida *albicans* pathogenicity mechanisms." Virulence. 2013, 4 (2): 119-28.
11. Hube, B., Stehr, F., Bossenz, M. *et al*. Secreted lipases of Candida *albicans*: cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members. Arch Microbiol. 2020; 174: 362–374.
12. Paraje MG, Correa SG, Renna MS, Theumer M, Sotomayor CE. Lipase secretada por Candida *albicans* induz lesão e esteatose em células imunes e parenquimatosas. Can J Microbiol . 2008;54(8):647-659.
13. Poma-Castillo L, Espinoza-Poma M, Mauricio F, Mauricio-Vilchez C, Alvétez-Temoche D, Mayta-Tovalino F. Antifungal Activity of Ethanol-extracted Bixa orellana (L) (Achiote) on Candida *albicans*, at Six Different Concentrations. J

Contemp Dent Pract. 2019; 20(10):1159-1163.

14. Chaughule RS, Barve RS. Role of herbal medicines in the treatment of infectious diseases. *Vegetos*. 2023; 1-11.

15. Rajizadeh MA, Najafipour H, Samareh Fekr M, et al. Anti-Inflammatory and Anti-Oxidative Effects of Myrtenol in the Rats with Allergic Asthma. *Iran J Pharm Res*. 2019;18(3):1488-1498.

16. Viana AFSC, Lopes MTP, Oliveira FTB, et al. (-)-Myrtenol accelerates healing of acetic acid-induced gastric ulcers in rats and in human gastric adenocarcinoma cells. *Eur J Pharmacol* . 2019;854:139-148.

17. Oliveira JP, Abreu FF, Bispo JMM, et al. Myrtenol Reduces Orofacial Nociception and Inflammation in Mice Through p38-MAPK and Cytokine Inhibition. *Front Pharmacol*. 2022;13:910219.

18. da Silva-Rocha, W. P., Lemos, V. L., Svidizisnki, T. I., Milan, E. P., & Chaves, G. M. *Candida* species distribution, genotyping and virulence factors of *Candida albicans* isolated from the oral cavity of kidney transplant recipients of two geographic regions of Brazil. *BMC oral health*, 2014; 14, 20.

19. CLSI. "Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Third Edition (M27-A3)". (Wayne, PA). 2008.

20. CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Fourth Informational Supplement (Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute), (Document M27–S4). 2012.

21. Chaves GM, Bates S, Maccallum DM, Odds FC. *Candida albicans* GRX2, encoding a putative glutaredoxin, is required for virulence in a murine model. *Genet Mol Res*. 2007;6:1051–63.

22. Liu H, Köhler J, Fink GR. Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a STE12 homolog. *Science*. 1995; 266(5191):1723-1726.

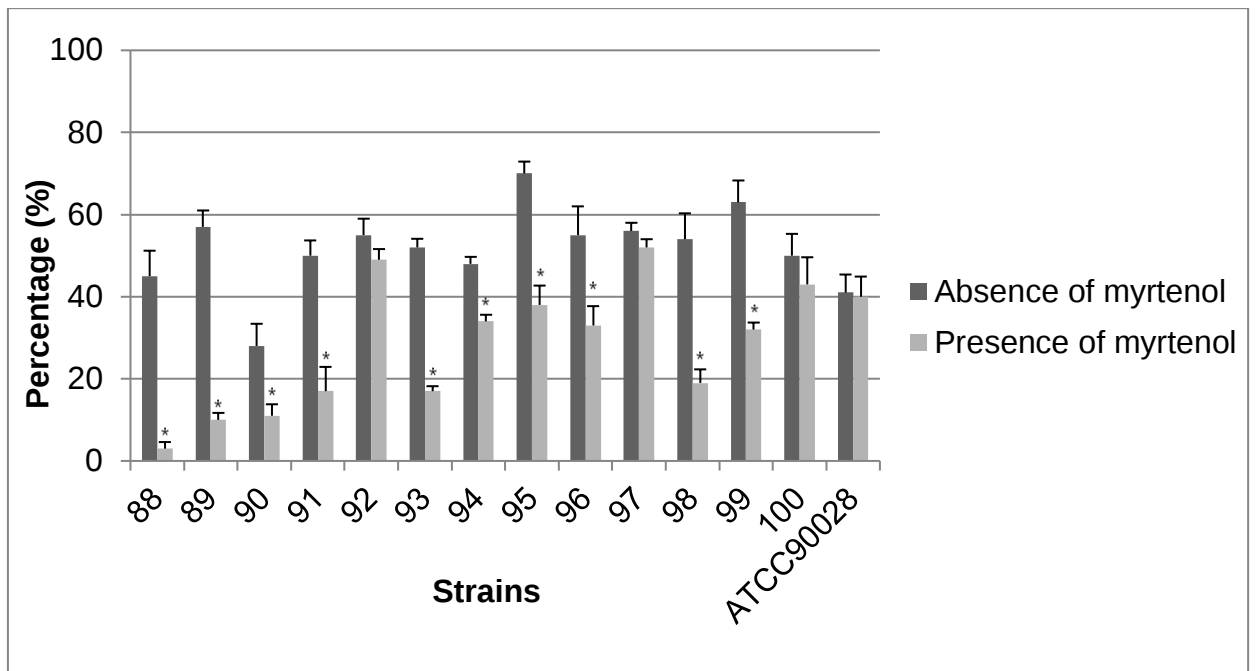
23. Mushin, TM, Aubaid, AH, Al-Duboon, H. Extracellular enzyme activities of dermatophytes and yeast isolates on solid media. *Mycoses*. 1997; 40: 465-469.

24. Jin Y, Samaranayake LP, Samaranayake Y, Yip HK. Biofilm formation of *Candida albicans* is variably affected by saliva and dietary sugars. *Arch Oral Biol*. 2004;49:789–98.

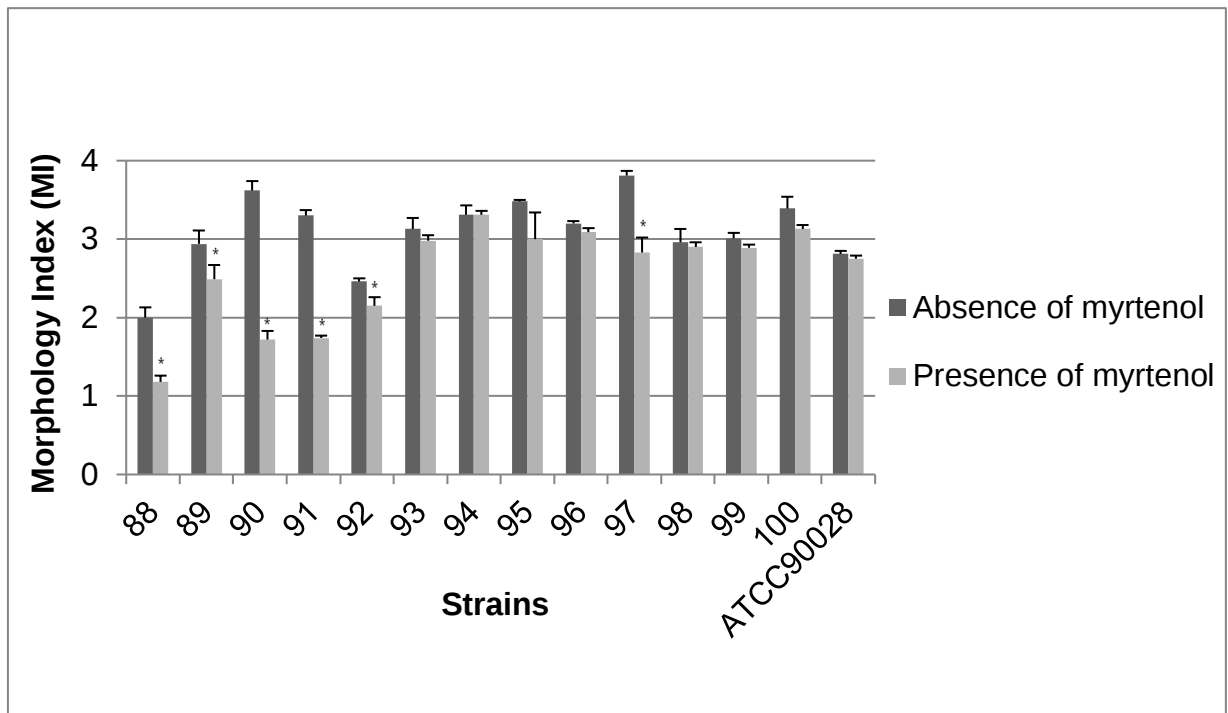
25. Mahmoud RY, Trizna EY, Sulaiman RK, et al. Increasing the Efficacy of Treatment of *Staphylococcus aureus*-*Candida albicans* Mixed Infections with Myrtenol. *Antibiotics* (Basel). 2022;11(12):1743.
26. Piras A, Falconieri D, Bagdonaite E, et al. Chemical composition and antifungal activity of supercritical extract and essential oil of *Tanacetum vulgare* growing wild in Lithuania. *Nat Prod Res*. 2014;28(21):1906-1909.
27. Aleksic V, Knezevic P. Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L. *Microbiol Res*. 2014;169(4):240-254.
28. Souza LBFC, Silva-Rocha WP, Ferreira MRA, et al. Influence of *Eugenia uniflora* Extract on Adhesion to Human Buccal Epithelial Cells, Biofilm Formation, and Cell Surface Hydrophobicity of *Candida* spp. from the Oral Cavity of Kidney Transplant Recipients. *Molecules* . 2018;23(10):2418.
29. Noites A, Araújo B, Machado J, Pinto E. Antifungal Potential of Some Herb Decoctions and Essential Oils on *Candida* Species. *Healthcare* (Basel). 2022;10(10):1820.
30. Silva-Rocha WP, de Brito Lemos VL, Ferreira MR, et al. Effect of the crude extract of *Eugenia uniflora* in morphogenesis and secretion of hydrolytic enzymes in *Candida albicans* from the oral cavity of kidney transplant recipients. *BMC Complement Altern Med* . 2015;15:6.
31. Acuna E, Ndlovu E, Molaeitabari A, Shahina Z, Dahms TES. Carvacrol-Induced Vacuole Dysfunction and Morphological Consequences in *Nakaseomyces glabratus* and *Candida albicans*. *Microorganisms*. 2023;11(12):2915.
32. Thakre, A., Zore, G., Kodgire, S., Kazi, R., Mulange, S., Patil, R., Shelar, A., Santhakumari, B., Kulkarni, M., Kharat, K., & Karuppayil, S. M. (2018). Limonene inhibits *Candida albicans* growth by inducing apoptosis. *Medical mycology*, 56(5), 565–578.
33. Raut, J. S., Shinde, R. B., Chauhan, N. M., Karuppayil, S. M. (2013). Terpenoids of plant origin inhibit morphogenesis, adhesion, and biofilm formation by *Candida albicans*. *Biofouling*, 29(1), 87–96.
34. Czechowicz P, Nowicka J, Gościński G. Virulence Factors of *Candida* spp. and Host Immune Response Important in the Pathogenesis of Vulvovaginal Candidiasis. *Int J Mol Sci*. 2022;23(11):5895.
35. Silva-Rocha WP, de Azevedo MF, Ferreira MRA, et al. Effect of the Ethyl Acetate Fraction of *Eugenia uniflora* on Proteins Global Expression during

Morphogenesis in *Candida albicans*. *Front Microbiol* . 2017;8:1788.

36. Bramono K, Yamazaki M, Tsuboi R, Ogawa H. Comparison of proteinase, lipase and alpha-glucosidase activities from the clinical isolates of *Candida* species. *Jpn J Infect Dis*. 2006;59(2):73-76.
37. Oliveira AC, Fernandes ML, Mariano AB. Production and characterization of an extracellular lipase from *Candida guilliermondii*. *Braz J Microbiol*. 2015;45(4):1503-1511.
38. Toth R, Toth A, Vagvolgyi C, Gacsér A. *Candida parapsilosis* Secreted Lipase as an Important Virulence Factor. *Curr Protein Pept Sci*. 2017;18(10):1043-1049.
39. Park M, Do E, Jung WH. Lipolytic enzymes involved in the virulence of human pathogenic fungi. *Mycobiology*. 2013;41(2):67-72.
40. Chin VK, Lee TY, Rusliza B, Chong PP. Dissecting *Candida albicans* Infection from the Perspective of *C. albicans* Virulence and Omics Approaches on Host-Pathogen Interaction: A Review. *Int J Mol Sci*. 2016;17(10):1643.
41. Prasath KG, Tharani H, Kumar MS, Pandian SK. Palmitic Acid Inhibits the Virulence Factors of *Candida tropicalis*: Biofilms, Cell Surface Hydrophobicity, Ergosterol Biosynthesis, and Enzymatic Activity. *Front Microbiol*. 2020;11:864.
42. Gácsér A, Stehr F, Kröger C, Kredics L, Schäfer W, Nosanchuk JD. Lipase 8 affects the pathogenesis of *Candida albicans*. *Infect Immun*. 2007;75(10):4710-4718.
43. Nobile CJ, Johnson AD. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. *Annu Rev Microbiol*. 2015;69:71-92.
44. Desai JV, Mitchell AP. *Candida albicans* Biofilm Development and Its Genetic Control. *Microbiol Spectr*. 2015;3(3):10.1128.
45. Uppuluri P, Chaturvedi AK, Srinivasan A, et al. Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. *PLoS Pathog*. 2010;6(3):e1000828.



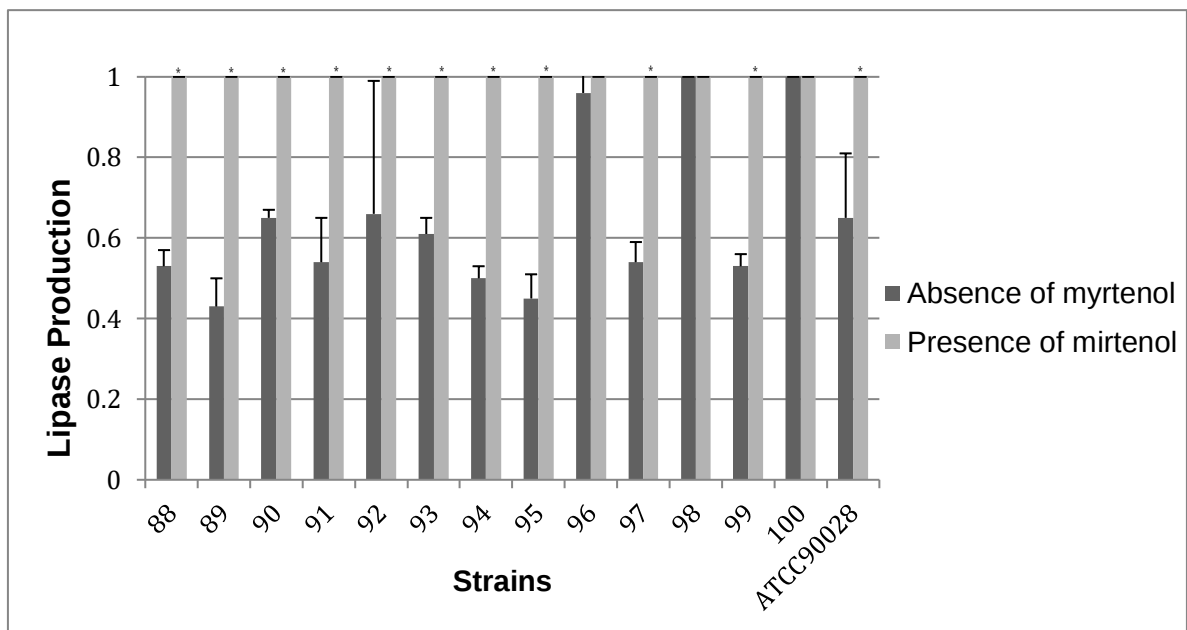
**Figure 1.** Mean percentages of germ tube formation in liquid medium (YPD + 20% SFB) after 1 hour of incubation at 37°C in the absence and presence of (-)-myrtenol. \*P < 0.05



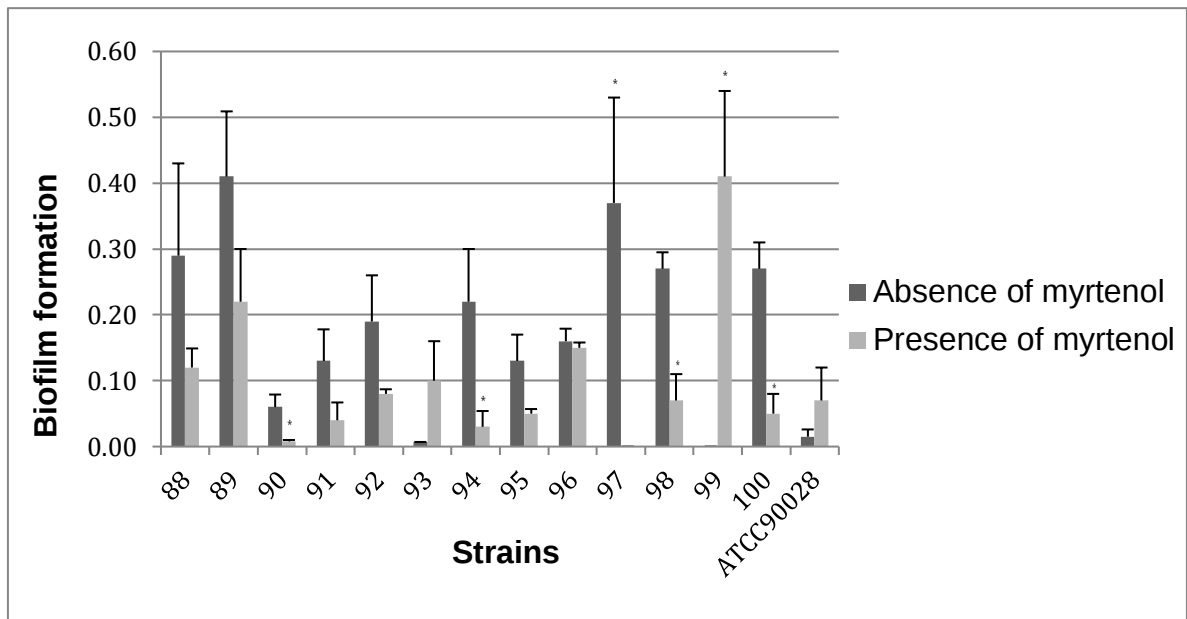
**Figure 2.** Mean Morphology Index (MI) in liquid medium (YPD + 20% SFB) after 3 hours of incubation at 37°C in the absence and presence of (-)-myrtenol. \*P < 0.05

**Table 1.** Hyphal formation on spider solid medium by oral clinical isolates of *Candida albicans*. isolates were incubated in triplicates at 30°C for seven days in Spider medium in the absence or presence of (-)-myrtenol.

| Spider medium |                                                         |
|---------------|---------------------------------------------------------|
| Strain        | Absence of (-)-myrtenol vs.<br>Presence of (-)-myrtenol |
| Strain 88     | Smooth vs. Smooth                                       |
| Strain 89     | Wrinkled vs. Smooth                                     |
| Strain 90     | Smooth vs. Smooth                                       |
| Strain 91     | Smooth vs. Smooth                                       |
| Strain 92     | Smooth vs. Smooth                                       |
| Strain 93     | Smooth vs. Smooth                                       |
| Strain 94     | Smooth vs. Smooth                                       |
| Strain 95     | Smooth vs. Smooth                                       |
| Strain 96     | Smooth vs. Smooth                                       |
| Strain 97     | Wrinkled vs. Smooth                                     |
| Strain 98     | Smooth vs. Smooth                                       |
| Strain 99     | Wrinkled vs. Smooth                                     |
| Strain 100    | Wrinkled vs. Wrinkled                                   |
| ATCC 90028    | Smooth vs. Smooth                                       |



**Figure 3.** Mean lipase activity of *Candida albicans* isolates in the presence and absence of (-)-myrtenol \*P < 0.05



**Figure 4.** Mean biofilm formation of *Candida albicans* isolates in the presence and absence of (-)-myrtenol after incubation in YNB medium for 66 hours at 37°C. \*P < 0.05

## 5. CONCLUSÃO

Esse foi o primeiro estudo que avaliou a ação do (-)-mirtenol nos fatores de virulência em isolados clínicos orais de *Candida albicans*, mostrando haver nos ensaios de morfogênese realizados redução significativa na formação de tubo germinativo e filamentação e para a maioria dos isolados redução na formação de biofilme e secreção da enzima lipase. Com isso, é possível destacar o potencial que esse composto possui como recurso terapêutico na inibição do desenvolvimento da candidíase oral.

## REFERÊNCIAS

1. França, FS, Leite, SB. Micologia e virologia. SAGAH. 2018; 1: 123-124.
2. Lopes JP, Lionakis MS. Patogênese e virulência de *Candida albicans*. Virulência . 2022; 13(1): 89-121. doi:10.1080/21505594.2021.2019950.
3. Lu H, Hong T, Jiang Y, Whiteway M, Zhang S. Candidiasis: From cutaneous to systemic, new perspectives of potential targets and therapeutic strategies. Adv Drug Deliv Rev. 2023; 199:114960. doi:10.1016/j.addr.2023.114960.
4. Almeida, OP. Patologia oral. (Abeno). Artes Médicas. 2016; 1:43.
5. Neville, B. Patologia oral e maxilofacial. Elsevier. 2009; 3: 972.
6. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. Virulence. 2013; 4(2): 119-128. doi:10.4161/viru.22913.
7. Zuza-Alves DL, Silva-Rocha WP, Chaves GM. An Update on *Candida tropicalis* Based on Basic and Clinical Approaches. Front Microbiol. 2017; 8: 1927. Published 2017 Oct 13. doi:10.3389/fmicb.2017.01927.
8. Kessler SQS, Lang PM, Dal-Pizzol TS, Montagner F. Resistance profiles to antifungal agents in *Candida albicans* isolated from human oral cavities: systematic review and meta-analysis. Clin Oral Investig. 2022; 26(11): 6479-6489. doi:10.1007/s00784-022-04716-2.
9. Christoffoli MT, Bachesk AB, Farah GJ, Ferreira GZ. Assessment of *Passiflora incarnata* L for conscious sedation of patients during the extraction of mandibular third molars: a randomized, split-mouth, double-blind, crossover study. Quintessence Int. 2021;52(10): 868-878. doi:10.3290/j.qi.b1492199.
10. Isola G, Matarese M, Ramaglia L, Iorio-Siciliano V, Cordasco G, Matarese G. Efficacy of a drug composed of herbal extracts on postoperative discomfort after surgical removal of impacted mandibular third molar: a randomized, triple-blind, controlled clinical trial. Clin Oral Investig. 2019; 23(5): 2443-2453. doi:10.1007/s00784-018-2690-9.
11. Mrabti, HN., Jaouadi, I., Zeouk, I., Ghchime, R., El Menyiy, N., Omari, NE., Balahbib, A., et al. Biological and Pharmacological Properties of Myrtenol: A

---

\* 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.

- Review. Curr Pharm Des. 2023; 29(6): 407-414. doi:10.2174/1381612829666221222121041.
12. Oliveira, JP., Abreu, FF., Bispo, JMM., Cerqueira, ARA., Dos Santos, JR., Correa, CB., *et al.* Myrtenol Reduces Orofacial Nociception and Inflammation in Mice Through p38-MAPK and Cytokine Inhibition. Front Pharmacol . 2022; 13: 910219. Publicado em 30 de maio de 2022. doi:10.3389/fphar.2022.910219.
  13. Huang S, Tan Z, Cai J, Wang Z, Tian Y. Myrtenol improves brain damage and promotes angiogenesis in rats with cerebral infarction by activating the ERK1/2 signalling pathway. Pharm Biol. 2021; 59(1): 584-593. doi:10.1080/13880209.2021.1917626.
  14. Maione, A., La Pietra, A., de Alteriis, E., Mileo, A., De Falco, M., Guida, M., *et al.* Effect of Myrtenol and Its Synergistic Interactions with Antimicrobial Drugs in the Inhibition of Single and Mixed Biofilms of *Candida auris* and *Klebsiella pneumoniae*. Microorganisms. 2022; 10(9): 1773. Published 2022 Sep 2. doi:10.3390/microorganisms10091773.
  15. Germano, VE, Xavier, CMR, Jales, MMS, Albuquerque, TVG, De Lima, ELF, Ribeiro, LH. Microrganismos habitantes da cavidade oral e sua relação com patologias orais e sistêmicas: revisão de literatura. Rev. Ciênc. Saúde Nova Esperança. 2018; 16; 91-99.
  16. Taverne-Ghadwal, L., Kuhns, M., Buhl, T., Schulze, MH, Mbaitolum, WJ, Kersch, L., *et al.* Epidemiology and Prevalence of Oral Candidiasis in HIV Patients From Chad in the Post-HAART Era. Front Microbiol. 2022; 13: 844069.
  17. Gupta B, Gupta S, Chaudhary M, Raj AT, Awan KH, Patil S. Oral candida prevalence and species specificity in leprosy. Dis Mon. 2020; 66(7): 100920.
  18. Santos, PSS, Motta, ACF. Guia prático de estomatologia. Editora Manole. 2022,
  19. Santana IL, Gonçalves LM, de Vasconcellos AA, da Silva WJ, Cury JA, Del Bel Cury AA. Dietary carbohydrates modulate *Candida albicans* biofilm development on the denture surface. PLoS One. 2013; 8(5): e64645. Published 2013 May 30. doi:10.1371/journal.pone.0064645.
  20. Pereira FGA, Milagres A, Werneck JT, Marques LC, Picciani BLS, Junior AS. Oral candidiasis in patients with haematological diseases: Diagnosis through

- clinical and cytopathological examinations. *Cytopathology*. 2022;33(5):611-617. doi:10.1111/cyt.13151.
21. Mäkinen AI, Mäkitie A, Meurman JH. Candida prevalence in saliva before and after oral cancer treatment. *Surgeon*. 2021; 19(6): e446-e451. doi:10.1016/j.surge.2021.01.006.
  22. Dedivitis RA, Jr. JNRA, Mahmoud A. *Atlas de Estomatologia*. 2023; 1: 15-19.
  23. Talapko, Jasminka et al. Candida albicans-The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*. 2021; vol. 7 (2). doi:10.3390/jof7020079.
  24. Aguayo, S., Marshall, H., Pratten, J., Bradshaw, D., Brown, JS., Porter, SR et al. Early Adhesion of Candida *albicans* onto Dental Acrylic Surfaces. *J Dent Res*. 2017; 96(8): 917-923. doi:10.1177/0022034517706354.
  25. Chen H, Zhou X, Ren B, Cheng L. The regulation of hyphae growth in Candida *albicans*. *Virulence*. 2020; 11(1): 337-348.
  26. Czechowicz P, Nowicka J, Gościński G. Virulence Factors of Candida spp. and Host Immune Response Important in the Pathogenesis of Vulvovaginal Candidiasis. *Int J Mol Sci*. 2022; 23(11): 5895. Published 2022 May 24. doi:10.3390/ijms23115895.
  27. De Souza, NM, Serpa, MN, da Silva, MCO.; da Silva, RO. Morphological Aspects of Yeasts Isolated from Fruits and Flowers. *Braz. J. Develop*. 2021, 7, 40309-40319.
  28. Pinto E, Ribeiro IC, Ferreira NJ, Fortes CE, Fonseca PA, Figueiral MH. Correlation between enzyme production, germ tube formation and susceptibility to fluconazole in Candida species isolated from patients with denture-related stomatitis and control individuals. *J Oral Pathol Med*. 2008; 37(10): 587-592. doi:10.1111/j.1600-0714.2008.00687.x.
  29. Pereira CA, Domingues N, Araújo MI, Junqueira JC, Back-Brito GN, Jorge AO. Production of virulence factors in Candida strains isolated from patients with denture stomatitis and control individuals. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016; 85(1): 66-72.
  30. Villa, S., Hamideh, M., Weinstock, A., Qasim, MN., Hazbun, TR., Sellam, A., et al. Transcriptional control of hyphal morphogenesis in Candida *albicans*. *FEMS Yeast Res*. 2020; 20(1): foaa005. doi:10.1093/femsyr/foaa005.
  31. Morschhäuser J. Nitrogen regulation of morphogenesis and protease secretion

- in *Candida albicans*. *Int J Med Microbiol*. 2011; 301(5): 390-394. doi:10.1016/j.ijmm.2011.04.005.
32. Robbins N, Cowen LE. Roles of Hsp90 in *Candida albicans* morphogenesis and virulence. *Curr Opin Microbiol*. 2023; 75:102351. doi:10.1016/j.mib.2023.102351.
  33. Fan Y, He H, Dong Y, Pan H. Hyphae-specific genes HGC1, ALS3, HWP1, and ECE1 and relevant signaling pathways in *Candida albicans*. *Mycopathologia*. 2013; 176(5-6): 329-335. doi: 10.1007/s11046-013-9684-6.
  34. Hsu CC, Lai WL, Chuang KC, Lee MH, Tsai YC. The inhibitory activity of linalool against the filamentous growth and biofilm formation in *Candida albicans*. *Med Mycol*. 2013;51(5):473-482.
  35. Zhong, H., Hu, DD, Hu, GH, Su, J., Bi, S., Zhang, ZE, *et al*. Activity of Sanguinarine against *Candida albicans* Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 61(5): e02259-16. Published 2017 Apr 24. doi: 10.1128/AAC.02259-16.
  36. Tsang PW, Bandara HM, Fong WP. Purpurin suppresses *Candida albicans* biofilm formation and hyphal development. *PLoS One*. 2012; 7(11): e50866. doi: 10.1371/journal.pone.0050866.
  37. Manoharan RK, Lee JH, Kim YG, Lee J. Alizarin and Chrysazin Inhibit Biofilm and Hyphal Formation by *Candida albicans*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017; 7: 447. Published 2017 Oct 16. doi:10.3389/fcimb.2017.00447.
  38. Lin, MY, Yuan, ZL, Hu, DD, Hu, GH, Zhang, RL, Zhong, H., *et al*. Effect of loureirin A against *Candida albicans* biofilms. *Chin J Nat Med*. 2019; 17(8): 616-623. doi: 10.1016/S1875-5364(19) 30064-0.
  39. Bravo-Chaucanés, CP., Chitiva, LC., Vargas-Casanova, Y., Diaz-Santoyo, V., Hernández, AX., Costa, GM., *et al*. Exploring the Potential Mechanism of Action of Piperine against *Candida albicans* and Targeting Its Virulence Factors. *Biomolecules*. 2023; 13(12): 1729. Published 2023 Nov 30. doi: 10.3390/biom13121729.
  40. Rodriguez-Canales, M., Medina-Romero, YM., Rodriguez-Monroy, MA., Nava-Solis, U., Bolaños-Cruz, SI., Mendoza-Romero, MJ., *et al*. Activity of propolis from Mexico on the proliferation and virulence factors of *Candida albicans*. *BMC Microbiol*. 2023; 23(1): 325. Published 2023 Nov 4. doi: 10.1186/s12866-023-03064-9.

41. Rodríguez-Cerdeira, C., Gregorio, MC., Molares-Vila, A., López-Barcenas, A., Fabbrocini, G., Bardhi, B., *et al.* Biofilms and vulvovaginal candidiasis. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2019; 174: 110-125. doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.11.011.
42. McCall AD, Pathirana RU, Prabhakar A, Cullen PJ, Edgerton M. *Candida albicans* biofilm development is governed by cooperative attachment and adhesion maintenance proteins [published correction appears in *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2021 Dec 16;7(1):91. doi: 10.1038/s41522-021-00264-x]. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2019; 5(1): 21. Published 2019 Aug 23. doi: 10.1038/s41522-019-0094-5.
43. Farkash Y, Feldman M, Ginsburg I, Steinberg D, Shalish M. Polyphenols Inhibit *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* Biofilm Formation. *Dent J (Basel)*. 2019; 7(2): 42. Published 2019 Apr 11. doi: 10.3390/dj7020042.
44. Wall G, Montelongo-Jauregui D, Vidal Bonifacio B, Lopez-Ribot JL, Uppuluri P. *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*. 2019; 52:1-6. doi: 10.1016/j.mib.2019.04.001.
45. de Barros PP, Rossoni RD, de Souza CM, Scorzoni L, Fenley JC, Junqueira JC. *Candida* Biofilms: An Update on Developmental Mechanisms and Therapeutic Challenges. *Mycopathologia*. 2020; 185(3): 415-424. doi: 10.1007/s11046-020-00445-w.
46. Martins, M., Henriques, M., Ribeiro, AP, Fernandes, R., Gonçalves, V., Seabra, A., *et al.* Oral *Candida* carriage of patients attending a dental clinic in Braga, Portugal. *Rev Iberoam Micol*. 2010; 27(3): 119-124. doi: 10.1016/j.riam.2010.03.007.
47. Mothibe JV, Patel M. Pathogenic characteristics of *Candida albicans* isolated from oral cavities of denture wearers and cancer patients wearing oral prostheses. *Microb Pathog* 2017; 110: 128-134. doi: 10.1016/j.micpath.2017.06.036.
48. Arnaiz-Garcia ME, Arnaiz-Garcia AM, Iscar-Galán A, Arnaiz J, González-Santos JM. Bioprosthetic mitral and aortic valve endocarditis associated with *Candida Albicans*. *Turk Kardiyol Dern Ars*. 2021; 49(5): 424. doi:10.5543/tkda.2021.78176.
49. Lafuente-Ibáñez de Mendoza I, Cayero-Garay A, Quindós-Andrés G, Aguirre-Urizar JM. A systematic review on the implication of *Candida* in peri-implantitis. *Int J Implant Dent*. 2021; 7(1): 73. Published 2021 Jun 17. doi:

10.1186/s40729-021-00338-7.

50. Lohse MB, Gulati M, Johnson AD, Nobile CJ. Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nat Rev Microbiol.* 2018; 16(1): 19-31. doi: 10.1038/nrmicro.2017.107.
51. Vitális, E., Nagy, F., Tóth, Z., Forgács, L., Bozó, A., Kardos, G., *et al.* *Candida* biofilm production is associated with higher mortality in patients with Candidaemia. *Mycoses.* 2020;63(4): 352-360. doi: 10.1111/myc.13049.
52. BRASIL. Ministério da Saúde. Candidíase sistêmica - situação epidemiológica, 2020.
53. Li WS, Chen YC, Kuo SF, Chen FJ, Lee CH. The Impact of Biofilm Formation on the Persistence of Candidemia. *Front Microbiol.* 2018;9:1196. Published 2018 Jun 4. doi:10.3389/fmicb.2018.01196.
54. Monfredini PM, Souza ACR, Cavaleiro RP, Siqueira RA, Colombo AL. Clinical impact of *Candida* spp. biofilm production in a cohort of patients with candidemia. *Med Mycol.* 2018; 56(7): 803-808. doi: 10.1093/mmy/myx133.
55. Hernandez-Cuellar, E., Guerrero-Barrera, AL., Avelar-Gonzalez, FJ., Díaz, JM., Santiago, AS., Chávez-Reyes, J., *et al.* Characterization of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* polymicrobial biofilm on different surfaces. *Rev Iberoam Micol.* 2022; 39(2): 36-43. doi: 10.1016/j.riam.2022.04.001.
56. Ponde NO, Lortal L, Ramage G, Naglik JR, Richardson JP. *Candida albicans* biofilms and polymicrobial interactions. *Crit Rev Microbiol.* 2021; 47(1): 91-111. doi: 10.1080/1040841X.2020.1843400.
57. Martorano-Fernandes L, Goodwine JS, Ricomini-Filho AP, Nobile CJ, Del Bel Cury AA. *Candida albicans* Adhesins Als1 and Hwp1 Modulate Interactions with *Streptococcus mutans*. *Microorganisms.* 2023; 11(6): 1391. Published 2023 May 25. doi: 10.3390/microorganisms11061391.
58. Falsetta, ML, Klein, MI, Colonne, PM, Scott-Anne, K., Gregoire, S., Pai, CH., *et al.* Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. *Infect Immun.* 2014; 82(5): 1968-1981. doi: 10.1128/IAI.00087-14.
59. Gharaghani M, Shabanzadeh M, Jafarian H, Zarei Mahmoudabadi A. ABC typing and extracellular enzyme production of *Candida albicans* isolated from *Candida* vulvovaginitis. *J Clin Lab Anal.* 2022; 36(1): e24117.

doi:10.1002/jcla.24117.

60. Fule SR, Das D, Fule RP. Detection of phospholipase activity of *Candida albicans* and non *albicans* isolated from women of reproductive age with vulvovaginal candidiasis in rural area. *Indian J Med Microbiol.* 2015; 33(1): 92-95. doi: 10.4103/0255-0857.148392.
61. Ramos, LS, Figueiredo-Carvalho, MH, Barbedo, LS, Ziccardi, M., Chaves, AL, Zancopé-Oliveira, RM., *et al.* *Candida haemulonii* complex: species identification and antifungal susceptibility profiles of clinical isolates from Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(1): 111-115. doi:10.1093/jac/dku321.
62. Orlandini RK, Bepu DAN, Saraiva MDCP, Bollela VR, Motta ACF, Lourenço AG. Are *Candida albicans* isolates from the oral cavity of HIV-infected patients more virulent than from non-HIV-infected patients? Systematic review and meta-analysis. *Microb Pathog.* 2020;149:104477. doi:10.1016/j.micpath.2020.104477.
63. da Silva-Rocha WP, Lemos VL, Svidizisnki TI, Milan EP, Chaves GM. *Candida* species distribution, genotyping and virulence factors of *Candida albicans* isolated from the oral cavity of kidney transplant recipients of two geographic regions of Brazil. *BMC Oral Health.* 2014;14: 20. Published 2014 Mar 15. doi: 10.1186/1472-6831-14-20.
64. Silva-Rocha, WP, de Brito Lemos, VL, Ferreira, MR, Soares, LA, Svidziszni, TI, Milan, EP; *et al.* Effect of the crude extract of *Eugenia uniflora* in morphogenesis and secretion of hydrolytic enzymes in *Candida albicans* from the oral cavity of kidney transplant recipients. *BMC Complement Altern Med.* 2015; 15: 6. Published 2015 Feb 5. doi:10.1186/s12906-015-0522-x.
65. Nciki S, Oderinlo OO, Gulube Z, Osamudiamen PM, Idahosa KC, Patel M. *Mezoneuron benthamianum* inhibits cell adherence, hyphae formation, and phospholipase production in *Candida albicans*. *Arch Microbiol.* 2020; 202(9): 2533-2542. doi: 10.1007/s00203-020-01972-2.
66. Lopes JP, Lionakis MS. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Virulence.* 2022;13(1):89-121. doi:10.1080/21505594.2021.2019950.
67. Ramage G, Rajendran R, Sherry L, Williams C. Fungal biofilm resistance. *Int J Microbiol.* 2012; 2012: 528521. doi:10.1155/2012/528521.
68. Dubois, VA, González, MI, Martínez, ME, Fedelli, L., Lamas, S., D Eramo, LR, *et al.* Enzyme production by *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* in

- periodontal HIV-positive patients receiving and not receiving antiretroviral therapy. Producción enzimática de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* de pacientes con periodontitis VIH+ con y sin tratamiento antirretroviral. *Acta Odontol Latinoam*. 2020; 33(2): 104-111.
69. Jafarian H, Gharaghani M, Seyedian SS, Mahmoudabadi AZ. Genotyping, antifungal susceptibility, enzymatic activity, and phenotypic variation in *Candida albicans* from esophageal candidiasis. *J Clin Lab Anal*. 2021; 35(7): e23826. doi: 10.1002/jcla.23826.
  70. El-Baz, AM, Mosbah, RA, Goda, RM, Mansour, B., Sultana, T., Dahms, TES, *et al*. Back to Nature: Combating *Candida albicans* Biofilm, Phospholipase and Hemolysin Using Plant Essential Oils. *Antibiotics (Basel)*. 2021; 10(1): 81. Published 2021 Jan 15. doi: 10.3390/antibiotics10010081.
  71. Paraje MG, Correa SG, Renna MS, Theumer M, Sotomayor CE. *Candida albicans*-secreted lipase induces injury and steatosis in immune and parenchymal cells. *Can J Microbiol*. 2008; 54(8): 647-659. doi: 10.1139/w08-048.
  72. Poma-Castillo L, Espinoza-Poma M, Mauricio F, Mauricio-Vilchez C, Alvérez-Temoche D, Mayta-Tovalino F. Antifungal Activity of Ethanol-extracted *Bixa orellana* (L) (Achiote) on *Candida albicans*, at Six Different Concentrations. *J Contemp Dent Pract*. 2019; 20(10): 1159-1163. Published 2019 Oct 1.
  73. Trofa D, Soghier L, Long C, Nosanchuk JD, Gacser A, Goldman DL. A rat model of neonatal candidiasis demonstrates the importance of lipases as virulence factors for *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*. *Mycopathologia*. 2011; 172(3):169-178. doi: 10.1007/s11046-011-9429-3.
  74. Zhang, X., Zhao, S., Sun, L., Li, W., Wei, Q., Ashman, R., *et al*. Different virulence of *Candida albicans* is attributed to the ability of escape from neutrophil extracellular traps by secretion of DNase. *Am J Transl Res*. 2017; 9(1): 50-62. Published 2017 Jan 15.
  75. Pristov KE, Ghannoum MA. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. *Clin Microbiol Infect*. 2019; 25(7): 792-798. doi: 10.1016/j.cmi.2019.03.028.
  76. Lee Y, Puumala E, Robbins N, Cowen LE. Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and Beyond. *Chem Rev*. 2021;121(6): 3390-3411. doi: 10.1021/acs.chemrev.0c00199.

77. Agnelli, C., Guimarães, T., Sukiennik, T., Lima, PRP, Salles, MJ, Breda, GL., *et al.* Prognostic Trends and Current Challenges in Candidemia: A Comparative Analysis of Two Multicenter Cohorts within the Past Decade. *J Fungi (Basel)*. 2023; 9(4): 468. Published 2023 Apr 13. doi: 10.3390/jof9040468.
78. Szekely J, Rakchang W, Rattanaphan P, Kositpantawong N. Fluconazole and echinocandin resistance of *Candida* species in invasive candidiasis at a university hospital during pre-COVID-19 and the COVID-19 outbreak. *Epidemiol Infect.* 2023; 151:e146. Published 2023 Aug 25. doi: 10.1017/S0950268823001346.
79. Monroy-Pérez E, Rodríguez-Bedolla RM, Garzón J, Vaca-Paniagua F, Arturo-Rojas Jiménez E, Paniagua-Contreras GL. Marked virulence and azole resistance in *Candida albicans* isolated from patients with periodontal disease. *Microb Pathog.* 2020;148:104436. doi:10.1016/j.micpath.2020.104436.
80. Kessler SQS, Lang PM, Dal-Pizzol TS, Montagner F. Resistance profiles to antifungal agents in *Candida albicans* isolated from human oral cavities: systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Investig.* 2022; 26(11): 6479-6489. doi: 10.1007/s00784-022-04716-2.
81. Kermani, F., Taghizadeh-Armaki, M., Hosseini, SA., Amirrajab, N., Javidnia, J., Fami Zaghrami, M., *et al.* Antifungal Resistance of Clinical *Candida albicans* Isolates in Iran: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Iran J Public Health.* 2023; 52(2): 290-305. doi: 10.18502/ijph.v52i2.11874.
82. Chaughule RS, Barve RS. Role of herbal medicines in the treatment of infectious diseases. *Vegetos.* Published online January 18, 2023. doi: 10.1007/s42535-022-00549-2.
83. Dutra RC, Campos MM, Santos AR, Calixto JB. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacol Res.* 2016; 112: 4-29. doi: 10.1016/j.phrs.2016.01.021.
84. Moreira, MRC. Efeitos do monoterpeno (-)-mirtenol sobre o Sistema Nervoso Central: estudos *in vitro* e *in vivo*. Tese (Pós-graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO), Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa. 2013.
85. Mrabti, HN., Jaouadi, I., Zeouk, I., Ghchime, R., El Menyiy, N., Omari, NE., *et al.* Biological and Pharmacological Properties of Myrtenol: A Review. *Curr Pharm Des.* 2023; 29(6): 407-414. doi:

10.2174/138161282966221222121041.

86. Rajizadeh, MA., Najafipour, H., Samareh Fekr, M., Rostamzadeh, F., Jafari, E., Bejeshk, M. A., *et al.* Anti-Inflammatory and Anti-Oxidative Effects of Myrtenol in the Rats with Allergic Asthma. *Iran J Pharm Res.* 2019; 18(3): 1488-1498. doi: 10.22037/ijpr.2019.1100749.
87. Viana, AFSC, Lopes, MTP, Oliveira, FTB, Nunes, PIG, Santos, VG, Braga, AD, Silva., *et al.* (-)-Myrtenol accelerates healing of acetic acid-induced gastric ulcers in rats and in human gastric adenocarcinoma cells. *Eur J Pharmacol.* 2019; 854: 139-148. doi: 10.1016/j.ejphar.2019.04.025.
88. Cavalcanti, BB; Diniz neto, H.; Silva-rocha, WP da.; Lima, E. de O.; Barbosa Filho, JM; Castro, RD de., *et al.* Inhibitory Effect of (-)-myrtenol alone and in combination with antifungal agents on *Candida* spp. *Research, Society and Development.* 2021; v.10, n.15. doi: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i15.22434>.
89. Mahmoud, RY, Trizna, EY, Sulaiman, RK, Pavelyev, RS, Gilfanov, IR, Lisovskaya, SA., *et al.* Increasing the Efficacy of Treatment of *Staphylococcus aureus*-*Candida albicans* Mixed Infections with Myrtenol. *Antibiotics (Basel).* 2022; 11(12): 1743. Published 2022 Dec 2. doi: 10.3390/antibiotics11121743.
90. Piras, A., Falconieri, D., Bagdonaite, E., Maxia, A., Gonçalves, MJ, Cavaleiro, C., *et al.* Chemical composition and antifungal activity of supercritical extract and essential oil of *Tanacetum vulgare* growing wild in Lithuania. *Nat Prod Res.* 2014; 28(21): 1906-1909. doi: 10.1080/14786419.2014.939085.

## **ANEXO 1**

Normas do periódico "Medical Mycology" ISSN: 1460-2709/ Qualis Capes Odontologia A1

- Uma página de rosto que inclua o título completo do artigo e um título curto; o(s) nome(s), o(s) grau(s) acadêmico(s) mais alto(s) e afiliação(ões) — incluindo países — de todos os autores; o nome, número de telefone e endereço de e-mail do autor correspondente designado; e uma lista de até 5 palavras-chave;
- Uma página separada para um Resumo de até 250 palavras preparado sem subtítulos;
- Texto do manuscrito composto por Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências;
- As referências devem ser citadas sequencialmente na ordem em que aparecem pela primeira vez no texto, em numerais sobrescritos e incluídas na mesma ordem numérica na seção Referências;
- Cada tabela deve ser enviada como uma página separada e deve ter descrições em notas de rodapé de todas as abreviações contidas na tabela;
- Cada figura deve ser enviada como um arquivo separado (página), com legendas de figura apropriadas, permitindo que o leitor entenda seu conteúdo sem referência ao texto;
- Além dos requisitos detalhados em 'Preparação de Manuscrito' abaixo, esses manuscritos são limitados a 5.000 palavras, excluindo a página de rosto, o resumo, as referências e as tabelas/figuras.

## ANEXO 2

### Parecer consubstanciado do CEP

|                                                                                                                   |                                                                                    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| UFRN - HOSPITAL<br>UNIVERSITÁRIO ONOFRE<br>LOPES DA UNIVERSIDADE<br>FEDERAL DO RIO GRANDE DO<br>NORTE - HUOL/UFRN |  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|

#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Leveduras e fungos filamentosos isolados de pacientes hospitalizados: diagnóstico acurado e fatores de virulência.

**Pesquisador:** Guilherme Maranhão Chaves

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 23611519.6.0000.5292

**Instituição Proponente:** Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 5.325.573

##### Apresentação do Projeto:

Emenda onde pesquisador quer mudar de nosocômio para realizar a pesquisa para outro hospital.

A metodologia em si do projeto não será alterada. Em decorrência de um surto de candidemia em neonatos na MEJC, ocorrendo desde dezembro de 2021, a investigação sobre a fonte e rota de infecção, assim como comparações de genótipos moleculares de cepas isoladas de pacientes, com amostras oriundas do ambiente hospitalar e mãos de profissionais de saúde, com finalidade de controlar o surto de infecção hospitalar, será realizada. O trabalho certamente gerará dados para publicação científica.

##### Objetivo da Pesquisa:

Emenda mudando local de pesquisa.

##### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Descritas.

##### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Emenda a projeto com mudança de local.

|                                                                                                     |                                       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| <b>Endereço:</b> Avenida Nilo Peçanha, 620 - Prédio Administrativo - 1º Andar - Espaço João Machado |                                       |
| <b>Bairro:</b> Petrópolis                                                                           | <b>CEP:</b> 59.012-300                |
| <b>UF:</b> RN                                                                                       | <b>Município:</b> NATAL               |
| <b>Telefone:</b> (84)3342-5003                                                                      | <b>E-mail:</b> cep.huol@ebserh.gov.br |

UFRN - HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO ONOFRE  
LOPES DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO RIO GRANDE DO  
NORTE - HUOL/UFRN



Continuação do Parecer: 5.325.573

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Termo de anuência do novo cenário de pesquisa.

**Recomendações:**

- O CEP HUOL/UFRN informa ao pesquisador que está em vigor a Lei Geral de proteção de dados- LGPD, e, vem reforçar a orientação que a aludida Lei dispõe sobre a responsabilidade na proteção e guarda dos dados sensíveis coletados e manipulados. Assim reforça-se a importância do sigilo, guarda e consentimento utilização dos dados sob pena de possíveis responsabilizações de dados extraviados ou utilizados indevidamente, bem como aqueles coletados sem a anuência e/ou ciência da sua utilização, ou utilizados para fins diversos daqueles consentidos. O presente aviso tem a finalidade de reforçar à vigência da LGPD e orientar sobre a necessidade guarda e proteção de dados, como medida precaver da possibilidade de responsabilização do pesquisador em caso dados extraviados que estejam sob sua guarda/coleta.

- O CEP HUOL/UFRN alerta que, mesmo o projeto não apresentando óbices éticos e estando, dessa forma, aprovado, o desenvolvimento de etapas com participantes deverá ocorrer, preferencialmente, seguindo as recomendações das normas sanitárias vigentes da região durante a pandemia do coronavírus (COVID-19).

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem dilemas éticos.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

1. Apresentar relatório parcial da pesquisa, semestralmente, a contar do início da mesma.
2. Apresentar relatório final da pesquisa até 30 dias após o término da mesma.
3. O CEP HUOL deverá ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo.
4. Quaisquer documentações encaminhadas ao CEP HUOL deverão conter junto uma Carta de Encaminhamento, em que conste o objetivo e justificativa do que esteja sendo apresentado.
5. Caso a pesquisa seja suspensa ou encerrada antes do previsto, o CEP HUOL deverá ser comunicado, estando os motivos expressos no relatório final a ser apresentado.
6. O TCLE deverá ser obtido em duas vias, uma ficará com o pesquisador e a outra com o participante de pesquisa.

**Endereço:** Avenida Nilo Peçanha, 620 - Prédio Administrativo - 1º Andar - Espaço João Machado  
**Bairro:** Petrópolis **CEP:** 59.012-300  
**UF:** RN **Município:** NATAL  
**Telefone:** (84)3342-5003 **E-mail:** cep.huol@ebserh.gov.br

Página 02 de 04

Continuação do Parecer: 5.325.573

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Termo de anuência do novo cenário de pesquisa.

**Recomendações:**

- O CEP HUOL/UFRN informa ao pesquisador que está em vigor a Lei Geral de proteção de dados- LGPD, e, vem reforçar a orientação que a aludida Lei dispõe sobre a responsabilidade na proteção e guarda dos dados sensíveis coletados e manipulados. Assim reforça-se a importância do sigilo, guarda e consentimento utilização dos dados sob pena de possíveis responsabilizações de dados extraviados ou utilizados indevidamente, bem como aqueles coletados sem a anuência e/ou ciência da sua utilização, ou utilizados para fins diversos daqueles consentidos. O presente aviso tem a finalidade de reforçar a vigência da LGPD e orientar sobre a necessidade guarda e proteção de dados, como medida precaver da possibilidade de responsabilização do pesquisador em caso dados extraviados que estejam sob sua guarda/coleta.

- O CEP HUOL/UFRN alerta que, mesmo o projeto não apresentando óbices éticos e estando, dessa forma, aprovado, o desenvolvimento de etapas com participantes deverá ocorrer, preferencialmente, seguindo as recomendações das normas sanitárias vigentes da região durante a pandemia do coronavírus (COVID-19).

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem dilemas éticos.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

1. Apresentar relatório parcial da pesquisa, semestralmente, a contar do início da mesma.
2. Apresentar relatório final da pesquisa até 30 dias após o término da mesma.
3. O CEP HUOL deverá ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo.
4. Quaisquer documentações encaminhadas ao CEP HUOL deverão conter junto uma Carta de Encaminhamento, em que conste o objetivo e justificativa do que esteja sendo apresentado.
5. Caso a pesquisa seja suspensa ou encerrada antes do previsto, o CEP HUOL deverá ser comunicado, estando os motivos expressos no relatório final a ser apresentado.
6. O TCLE deverá ser obtido em duas vias, uma ficará com o pesquisador e a outra com o participante de pesquisa.

Endereço: Avenida Nilo Peçanha, 620 - Prédio Administrativo - 1º Andar - Espaço João Machado  
Bairro: Petrópolis CEP: 59.012-300  
UF: RN Município: NATAL  
Telefone: (84)3342-5003 E-mail: cep.huol@ebserh.gov.br

UFRN - HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO ONOFRE  
LOPES DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO RIO GRANDE DO  
NORTE - HUOL/UFRN



Continuação do Parecer: 5.325.573

**Necessita Apreciação da CONEP:**  
Não

NATAL, 01 de Abril de 2022

---

Assinado por:  
Jose diniz Junior  
(Coordenador(a))

**Endereço:** Avenida Nilo Peçanha, 520 - Prédio Administrativo - 1º Andar - Espaço João Machado  
**Bairro:** Petrópolis **CEP:** 59.012-300  
**UF:** RN **Município:** NATAL  
**Telefone:** (84)3342-5003 **E-mail:** cep.huol@ebserh.gov.br

Página 04 de 04