

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Prospecção antifúngica de óleos essenciais de plantas medicinais
frente a isolados clínicos de *Candida* spp. diagnosticados em pacientes do
Hospital de Odontologia da UFRGS**

Simone Krause Ferrão

Porto Alegre, 2020

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prospecção antifúngica de óleos essenciais de plantas medicinais frente a isolados clínicos de *Candida* spp. diagnosticados em pacientes do Hospital de Odontologia da UFRGS

**Tese de doutorado apresentada por
Simone Krause Ferrão para obtenção do GRAU DE
TÍTULO DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas**

Orientador (a): Profa. Dr. Renata Pereira Limberger

Co-Orientador(a): Profa. Dr. Adelina Mezzari

Porto Alegre, 2020

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 23.10.2020, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Daiane Dalla Lana

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Prof. Dr. Flávio Rodrigues da Silva Júnior

Universidade Federal de Rio Grande

Profa Dra. Miriam Anders Appel

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Ferrão, Simone Krause
Prospecção antifúngica de óleos essenciais de plantas medicinais frente a isolados clínicos de *Candida* spp. diagnosticados em pacientes do Hospital de Odontologia da UFRGS / Simone Krause Ferrão. -- 2020.

213 f.
Orientadora: Renata Pereira Limberger.

Coorientadora: Adelina Mezzari.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. *Candida*. 2. antifúngicos. 3. próteses dentárias. 4. óleos essenciais. I. Limberger, Renata Pereira, orient. II. Mezzari, Adelina, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

APRESENTAÇÃO

Esta tese foi desenvolvida sob a orientação da Profa. Dra. Renata Pereira Limberger e sob co-orientação Profa. Dra. Adelina Mezzari, nos Laboratórios de Toxicologia (Labtóxico), Micologia (Biomicolab) e Farmacognosia da Faculdade de Farmácia em parceria com o Hospital de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) através da Profa Dra Simone Luisi. O termo de anuência da Faculdade de Odontologia e os pareceres da Comissão de Pesquisa da Faculdade de Farmácia (nº80/2017) e do Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS (número 2.236.863) estão apresentadas nos ANEXO 1, 2 e 3, respectivamente.

A presente tese foi redigida de acordo com as normas vigentes no Estatuto do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS, organizada na forma de capítulos, permitindo a apresentação e discussão dos resultados obtidos em cada uma das etapas que compõem este estudo. Assim, este trabalho encontra-se dividido da seguinte forma:

1. Introdução;
2. Objetivo geral e específicos;
3. Mapa conceitual do estudo;
4. Revisão Bibliográfica;
5. Manuscrito I: Susceptibility profile of *Candida* spp. in dental prosthesis users
6. Manuscrito II: Adhesion and biofilm formation capacity of *Candida* spp. clinical isolates from dental prosthesis users
7. Manuscrito III: Atividade antifúngica de óleos essenciais frente a *Candida* spp.
8. Manuscrito IV: Antibiofilm activity of the essential oil of *Pelargonium graveolens* L'Her, *Cinnamomum cassia* L., *Syzygium aromaticum* L. Merr. & L.M. Perry and *Myristica fragrans* Houtt in clinical isolates of *Candida* spp.
9. Manuscrito V: Fingerprint-MS of clinical isolates of *Candida* by MALDI-TOF MS
10. Discussão
11. Conclusões;
12. Referências

Agradeço aos colaboradores mencionados pelo apoio e à CAPES, FAPERGS e CNPq pelo suporte financeiro recebido durante o desenvolvimento deste trabalho.

DEDICATÓRIA

À minha pequena Amanda.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que muitas e muitas vezes tiveram que me assistir em cuidados com a pequena, meu furacão de amor. E a Amandinha, por encarar com leveza e naturalidade a sua terceirização.

A professora Renata Pereira Limberger pela oportunidade, confiança, orientação e parceria durante o doutorado. A professora Adelina Mezzari, minha co-orientadora, pela presença constante e pelas palavras de incentivo quando tudo parecia não funcionar. A professoras Luciane Noal Calil pelo apoio durante a padronização da técnica de adesão celular.

A Faculdade de Farmácia que permite e incentiva a qualificação de seus servidores. Ao Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas - LACT e todas as servidoras que o representam, Laura Alencastro, Dariana Hubner, Luciana Lages e Márcia Trein, pelo apoio, arranjos de horários e compreensão para que fosse possível cursar as disciplinas no turno da manhã.

Aos amigos feitos durante o doutorado, do PPGF ou fora dele. A Juliana Butzge, pela parceria entusiasmada, nas coletas no Hospital de Odontologia e em vários experimentos no laboratório. A Letícia Mezzomo, pelo auxílio nos experimentos e na organização do material. Ao Anderson Ramos Carvalho, minha dupla em muitas disciplinas, meu primeiro help em estatística e quimiometria e pelos memes que alegam o percurso. As meninas da Bacteriologia pelo ambiente leve e de cooperação mútua, Gabriela Collar e Natália Moreira com quem compartilhava o laboratório. A Graciela Carlos pela preciosa colaboração nos 45 minutos do segundo tempo com vários questionamentos pertinentes ao tema. A todos os colegas do grupo de pesquisa pelos alertas e lembretes de prazos de matrícula, de inscrição no Encontro do Programa de Pós-graduação da Faculdade de Farmácia, das provas de proficiência e tantos outros eventos e obrigações.

A Vanessa Bergamo pela boa vontade, amizade e incansáveis correções na versão de língua inglesa dos manuscritos.

Aos meus amigos de longa data pela compreensão na ausência e pela ajuda remota toda vez que solicitados sob os mais diversos assuntos (instalação de programas, conversão de arquivos, recuperação de dados, ...).

RESUMO

A candidíase é uma micose oportunista ocasionada por leveduras do gênero *Candida*, a qual faz parte da microbiota do corpo humano, colonizando pele, cavidade oral e mucosas do trato genital, gastrointestinal e urinário. A epidemiologia da candidíase depende da predisposição do hospedeiro, carga parasitária e virulência fúngica. Vários fatores podem predispor ao desenvolvimento da candidíase oral, tais como, imunossupressão, xerostomia e uso de próteses dentárias. De uma forma geral, o tratamento da candidíase oral utiliza nistatina tópica como primeira escolha. Quando o tratamento tópico não for suficiente, fluconazol e itraconazol podem ser empregados, e em casos de candidíase invasiva, voriconazol, anfotericina B, micafungina e caspofungina são considerados tratamento de escolha. Entretanto, nas últimas décadas tem se observado um grande aumento da resistência aos antifúngicos disponíveis no mercado para a prática terapêutica em isolados clínicos. Justifica-se assim, a necessidade de prospecção de novos antifúngicos e nesse sentido, as plantas medicinais representam uma importante fonte renovável para a busca de outros agentes terapêuticos com potencial frente a cepas resistentes. Face ao exposto, este trabalho visa avaliar o perfil de suscetibilidade, capacidade de adesão e formação de biofilme das espécies do gênero *Candida* obtidas de isolados da cavidade oral em usuários de prótese dentária, bem como verificar a atividade antifúngica e antibiofilme dos óleos essenciais (OEs) de *Pelargonium graveolens* L'Her (gerânio; Geranaceae), *Cinnamomum cassia* L. (canela; Lauraceae), *Syzygium aromaticum* L. Merr. & L.M. Perry (cravo; Myrtaceae) e *Myristica fragrans* Houtt (noz-moscada; Myristicaceae) frente a estes isolados. Para tanto foi realizado o perfil de suscetibilidade destes isolados frente aos antifúngicos convencionais fluconazol, cetoconazol, itraconazol, nistatina e aos óleos essenciais de *Pelargonium graveolens* L'Her, *Cinnamomum cassia* L., *Syzygium aromaticum* L. Merr. & L.M. Perry e *Myristica fragrans* Houtt empregando o método de microdiluição em caldo segundo documento M27 A3/ M60 da CLSI. Também foi verificado a capacidade de aderência em célula epitelial oral, a capacidade de formação de biofilme pelo método do cristal violeta e a determinação da atividade antibiofilme dos óleos essenciais de *Pelargonium graveolens* L'Her, *Cinnamomum cassia* L., *Syzygium aromaticum* L. Merr. & L.M. Perry e *Myristica fragrans* Houtt pelos mesmos isolados. A identificação destes isolados foi realizada através MALDI-TOF MS Biotyper Bruker. Participaram deste estudo, 120

pacientes com e sem próteses dentárias removíveis. Obteve-se uma prevalência de 58,33% de *Candida* spp. nos usuários de prótese dentária e 33,33% no grupo controle (χ^2 de 7,55, gl 1, p 0,006) pelo teste do qui-quadrado. No grupo de usuários de prótese dentária *C. albicans* foi a espécie mais prevalente (47,36%) seguida de *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. glabrata*. No grupo controle *C. albicans* (55,00%) seguida de *C. lusitaniae* e *C. glabrata*. Não foi verificada diferença estatística quanto a suscetibilidade dos isolados nos dois grupos frente aos antifúngicos azólicos, observando-se apenas um menor número de isolados resistentes no grupo controle frente a nistatina (χ^2 4,298, gl1, p 0,03). Para a capacidade de formação de biofilme, os melhores resultados obtidos foram nos isolados provenientes do grupo usuários de prótese dentária e em *Candida* não-*albicans*, p <0,05. Os quatro óleos essenciais avaliados neste estudo apresentaram atividade antifúngica e antibiofilme frente aos isolados clínicos de *Candida* spp. Os óleos de canela e cravo apresentaram os melhores resultados para ambos os testes. Os resultados de prevalência de *Candida* spp. em usuários de prótese dentária removível e sua suscetibilidade frente aos antifúngicos podem auxiliar na escolha de abordagens terapêuticas para candidíase nestes pacientes. Os OEs apresentaram efeitos positivos frente a inibição do crescimento das espécies de *Candida* spp. e na diminuição da formação de biofilme constituindo uma alternativa para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos no tratamento da candidíase. Os resultados obtidos poderão ser extrapolados para estudos futuros com outros microrganismos ou outros óleos, uma vez que microrganismos de origem oral podem ser responsáveis por infecções sistêmicas. Aprovação da pesquisa no Comitê de Ética e Pesquisa da UFRGS, sob o número 2.236.863.

Palavras-chave: *Candida*, *Pelargonium*, *Cinnamomum*, *Syzygium*, *Myristica*, suscetibilidade, antifúngicos e próteses dentárias

ABSTRACT

Candidiasis is an opportunistic mycosis caused by yeasts of the genus *Candida*, which is part of the microbiota of the human body, colonizing skin, oral cavity and mucous membranes of the genital, gastrointestinal and urinary tract. The epidemiology of candidiasis depends on host predisposition, parasitic charge and fungal virulence. Several factors may predispose the development of oral candidiasis, such as immunosuppression, xerostomia and use of dental prostheses. Treatment of oral candidiasis uses topical nystatin. When treatment is not sufficient, fluconazole and itraconazole can be used, and in cases of invasive candidiasis, voriconazole, amphotericin B, micafungin and caspofungin are considered in the therapy. However, in recent decades there has been an increase in resistance to antifungals available for therapeutic practice in clinical isolates. This justifies the need to prospect for new antifungals. In this sense, vegetable drugs represent an important renewable source for the search for other therapeutic agents with potential in the face of resistant strains. In view of the report, this study aims to evaluate the susceptibility profile, adhesion capacity and biofilm formation of species of the genus *Candida* obtained from isolates of the oral cavity in users of dental prosthesis, as well as to verify the antifungal and antibiofilm activity of essential oils (EOs) of *Pelargonium graveolens* L'Her (geranium; Geranaceae), *Cinnamomum cassia* L. (cinnamon; Lauraceae), *Syzygium aromaticum* L. Merr. & L.M. Perry (clove; Myrtaceae) and *Myristica fragrans* Houtt (nutmeg; Myristicaceae) against these isolates. For this purpose, the susceptibility profile of these isolates was compared to conventional antifungals fluconazole, ketoconazole, itraconazole, nystatin and essential oils of *Pelargonium graveolens* L'Her, *Cinnamomum cassia* L. *Syzygium aromaticum* L. Merr. & L.M. Perry and *Myristica fragrans* Houtt using the broth microdilution method according to CLSI document M27 A3 / M60. The ability to adhere to an oral epithelial cell, the ability to biofilm by the violet crystal method and the determination of the antibiofilm activity of the essential oils of *Pelargonium graveolens* L'Her, *Cinnamomum cassia* L. *Syzygium aromaticum* L. Merr. & L.M. Perry and *Myristica fragrans* Houtt by the same isolates. The identification of these isolates was carried out using MALDI-TOF MS Biotyper Bruker. 120 patients participated in this study with and without removable dental prostheses. A prevalence of *Candida* spp. was 58.33% in dental users and 33.33% in the control group (χ^2 of 7.55, gl 1, p 0.006) in the chi-square test. In the group of dental

prosthesis users *C. albicans* was the most prevalent species (47.36%) followed by *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. glabrata*. In the control group *C. albicans* (55.00%) followed by *C. lusitaniae* and *C. glabrata*. No difference was found regarding the susceptibility of samples obtained from removable dental users and the control group against azole antifungals. There was only a smaller number of resistant isolates in the control group against nystatin (χ^2 4.298, df 1, p 0.03). For the biofilm formation capacity, the best results were obtained by isolates from users of dental prosthesis and *Candida* non-*albicans*, $p < 0.05$. The four essential oils evaluated in this study showed antifungal and antibiofilm activity against the clinical isolates of *Candida* spp. Cinnamon and clove oils showed the best results for both tests. The results of the prevalence of *Candida* spp. in users of removable dental prosthesis and their susceptibility to antifungal agents can help in the choice of therapeutic approaches for candidiasis in these patients. The OEs showed positive effects against the growth inhibition of *Candida* spp. and in the reduction of biofilm formation constituting an alternative for the development of new antifungal agents in the treatment of candidiasis. The results obtained can be extrapolated for future studies with other microorganisms or other oils, since microorganisms of oral origin may be responsible for systemic infections. Ethical approval by the Ethics and Research Committee of UFRGS, number 2,236,863.

Keywords: *Candida*, *Pelargonium*, *Cinnamomum*, *Syzygium*, *Myristica*, susceptibility, antifungal and dental prostheses.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama esquemático mostrando o funcionamento do MALDI-TOF MS (SINGHAL et al., 2015).....	38
Figura 2: Exemplos representativos de espectros de leveduras analisados por MALDI-TOF MS (SANTOS et al., 2011).	38
Figura 3: Relações e os mecanismos da resistência intrínseca e adquirida (REVIE et al., 2018).	40
Figura 4: Mecanismos de resistência antifúngica em <i>Candida</i> spp. (WHALEY et al., 2017). A) Alteração da composição de esterol e inativação de ERG 3; B) Captação de esterol exógeno C) Aumento da expressão de transportadores ABC; D) Aumento da expressão de transportadores MFS; E) Baixa afinidade ao fluconazol pela mutação em ERG 11; F) Aumento da expressão de ERG 11; G) Aneuploidia H) Mutação em ERG 11.....	42
Figura 5: Etapas de formação do biofilme (PIRRONE; PINCIROLI; BERRA, 2016).	45
Figura 6: Interações bacterianas célula a célula no biofilme da placa dental, com exemplos de sinergia e mutualismo. Linhas que ligam os microrganismos representam interações adesivas. Onde Aa é <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> (WRIGHT et al., 2013).	47
Figura 7: Diagrama de sinalização celular entre <i>Candida albicans</i> e estreptococos orais (WRIGHT et al., 2013).	48
Figura 8: Principais reações de degradação dos constituintes dos óleos essenciais. Adaptado(TUREK; STINTZING, 2013).....	52
Figura 9: <i>Pelargonium graveolens</i> L'Her (ALI et al., 2015).....	54
Figura 10: Principais constituintes de <i>Pelargonium graveolens</i> L'Her (SOUZA et al., 2016).	54
Figura 11: Casca de <i>Cinammomum cassia</i> L. (AL-SHAMIDAY; AL-MAMOORI, 2018).	56
Figura 12: Estrutura química do trans-cinamaldeído (KOT et al., 2015).....	57
Figura 13: <i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & Perr (RYU et al., 2016).....	58
Figura 14: Estrutura química do eugenol (FREIRES et al., 2015).	58
Figura 15: <i>Myristica fragrans</i> Houtt (MARGARET; NEERAJA, 2016).	59
Figura 16: Estrutura química de constituintes químicos presentes no óleo essencial de noz moscada. A) miristicina (DOLAN; MATULKA; BURDOCK, 2010) B) elimicina	

C) safrol (AL-MALAHMEH et al., 2017), D) sabineno E) limoneno F) mirceno (MA, 2012).....	60
Figura 17: Estrutura química da quitosana (LARANJEIRA; DE FÁVERE, 2009).....	63

LISTA DE ABREVIATURAS

AgrD	Autoinducing peptide
AHL	N-acil-homoserina
AI	Auto indutor
ATCC	American Type Culture Collection
C ALB	<i>Candida albicans</i>
C NALB	<i>Candida não-albicans</i>
CDR	<i>Candida albicans</i> multidrug resistance gene
CEPE	Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS
CG	Cromatografia gasosa
Chr5	Cromossomo 5
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory standards Institute
CN	Controle negativo
COSAT	Comissão de Saúde e Ambiente de Trabalho
CP	Controle positivo
CSD	Caldo Sabouraud dextrose 2 %
Da	Dalton
DO	Densidade ótica
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EM	Espectrometria de massas
EPS	Matrix extracelular polimérica
ERG	ETS-Related gene
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FAR	Farmácia
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FKS	FK hipersensitível gene
GC	Grupo controle
GPR	Grupo Usuários de Prótese dentária
GRAS	<i>Generally recognized as safe</i>
HIV	Síndrome da Imunodeficiência adquirida
ITS	Espaço interno transcrito

luxS	S-rybosilhomocisteine lyase gene
m	massa
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption / Ionisation Time-Of-Flight
MDR	Multi-Drug Resistance Gene
MFS	Major Facilitor Superfamily
MS	Mass Spectrometry
OE	Óleo essencial
OE Ca	Óleo essencial de canela
OE Cr	Óleo essencial de cravo
OE Ge	Óleo essencial de gerânio
OE Nz	Óleo essencial de noz moscada
PBS	Phosphate buffered saline
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PMMA	Polimetilmetacrilato
pH	Potencial hidrogenioco.
QS	<i>Quorumsensing</i>
R	Resistente
RENAME	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
RH	Rhesus
S	Sensível
SDD	Sensível dose dependente
spp.	Espécies
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TOF	Time of Flight
UFC	Unidade Formadora de Colonia
UNIC	Universidade de Cuiabá
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UV	Ultravioleta
z	Carga elétrica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. OBJETIVOS	25
2.1. Objetivo Geral	26
2.2. Objetivos Específicos	26
3. RESUMO GRÁFICO	27
4. REFERENCIAL TEÓRICO.....	29
4.1. Candidíase	30
4.2. Tratamento da candidíase oral.....	33
4.3 Identificação das espécies	35
4.4. Resistência antifúngica	39
4.4.1. Biofilmes	44
4.5. <i>Perfil de suscetibilidade</i>	49
4.6. <i>Óleos essenciais</i>	50
4.6.1. <i>Pelargonium graveolens</i> L'Her.....	53
4.6.2. <i>Cinnamomum cassia</i> L.	55
4.6.3. <i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & Perry.	57
4.6.4. <i>Myristica fragrans</i> Houtt.....	58
4.7. Interações farmacológicas	61
4.7.1. Quitosana	62
5. MANUSCRITO I:	65
6. MANUSCRITO II:	83
7. MANUSCRITO III	97
8. MANUSCRITO IV:.....	115
9. MANUSCRITO V:.....	137

10. DISCUSSÃO	149
11. CONCLUSÕES.....	175
12. REFERÊNCIAS	179

As micoses são doenças ocasionadas por fungos, organismos eucariontes, aclorofilados, saprófitos, simbioses ou parasitas, que podem causar no homem infecções superficiais, cutâneas, subcutâneas, sistêmicas ou oportunistas. Dentre os agentes de micoses oportunistas, destacam-se *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. e *Cryptococcus* spp. (BARBOSA; FARIA, 2014; GARCIA-CUESTA; SARRION-PEREZ; BAGAN, 2014; HANI et al., 2015; VILA et al., 2020).

Candida pertence à microbiota normal da cavidade oral, trato gastrointestinal e urinário do indivíduo (BARBOSA; FARIA, 2014; GARCIA-CUESTA; SARRION-PEREZ; BAGAN, 2014; HANI et al., 2015; VILA et al., 2020). A incidência de *Candida* spp. é reportada em diferentes grupos, sendo que de 30% em adultos saudáveis (ELTTEN et al., 2006) e 60% em usuários de próteses dentárias removíveis (MARCOS-ARIAS, et al., 2009), na qual a *C.albicans* é a espécie mais prevalente seguida de *C. tropicalis*, *C. guilhermondii*, *C. glabrata* e *C. parapslosis* (MARCO-ARIAS et al., 2009). A sua presença não implica necessariamente em quadros de infecção (LEITE et al., 2015), no entanto sob determinadas condições pode desenvolver desde manifestações clínicas mais superficiais e leves como a candidíase esofágica ou orofaríngea até infecções graves, como a candidemia (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

O desenvolvimento da candidíase oral é favorecido por uma combinação de fatores ligados ao indivíduo, como idade, condições imunossupressoras, tabagismo e utilização de próteses dentárias, bem como pelos fatores de virulência do microrganismo, como a propriedade de aderência aos tecidos e superfícies (dentes, materiais restauradores e próteses), capacidade de expressão de enzimas hidrolíticas e a formação de biofilmes (DE MELO; CONSIGLIERO GUERRA, 2014; MARTINS FILHO, 2015; NEVES-JUNIOR et al., 2015). A presença de um ou mais destes fatores favorece o desequilíbrio microrganismo/hospedeiro, permitindo o crescimento desordenado do fungo e a invasão de tecidos (DANGI; SONI; NAMDEO, 2010; DE MELO; CONSIGLIERO GUERRA, 2014; MARTINS FILHO, 2015; NEVES-JUNIOR et al., 2015).

A candidíase oral pode ser tratada com antifúngicos tópicos e sistêmicos os quais são apresentados em diferentes formas farmacêuticas. O tratamento da candidíase oral segundo *Guideline for the Management of Candidiasis* (2016) utiliza nistatina em suspensão como fármaco de primeira escolha, enquanto os outros

antifúngicos, como fluconazol e itraconazol são indicados quando o tratamento tópico foi ineficiente (GARCIA-CUESTA; SARRION-PEREZ; BAGAN, 2014; MIRANDA-CADENA et al., 2018). Em casos severos de candidíase orofaríngea faz-se o uso de voriconazol, anfotericina B ou as equinocandinas - caspofungina, micafungina e anidulafungina (PAPPAS et al., 2016). A maioria das espécies de *Candida* spp. tem apresentado boa susceptibilidade frente aos antifúngicos azólicos, no entanto *C. glabrata* tem sido menos susceptível aos azólicos e a *C. krusei* apresentando resistência intrínseca ao fluconazol (KATHIRAVAN et al., 2012; MIRANDA-CADENA et al., 2018). Há relatos também de casos de resistência de *Candida* spp. frente a anfotericina B, nistatina (CHANDRA et al., 2001), fluconazol (ARASTEHFAR et al., 2020), itraconazol (GOULART et al., 2018; ARASTEHFAR et al., 2020), cetoconazol (YUMI et al., 2004), voriconazol (ARASTEHFAR et al., 2020; RICARDO et al., 2020) e equinocandinas (DALLA LANA et al., 2020; SITTERLÉ et al., 2020). Com o aumento dos casos de resistência antifúngica, surge a necessidade da expansão e validação de novos agentes terapêuticos, e o reconhecimento da sua resistência (PFALLER, 2012).

Apesar da descoberta de novas moléculas e da disponibilidade de novas formulações para reduzir a toxicidade e aumentar a biodisponibilidade, a pesquisa de novos agentes antifúngicos é uma necessidade contínua já que o ritmo de desenvolvimento dos medicamentos antifúngicos não acompanha o ritmo das necessidades clínicas, especialmente no que tange ao desenvolvimento da resistência (LEE; LEE, 2018). Nesse sentido, as plantas medicinais representam uma importante fonte renovável para a busca de outros agentes terapêuticos com potencial terapêutico frente a cepas resistentes (SCORZONI et al., 2016).

Os principais grupos de metabólitos vegetais com atividade antimicrobiana incluem os alcaloides, taninos, flavonoides e óleos essenciais (SRINIVASAN; LOPEZ-RIBOT; RAMASUBRAMANIAN, 2014; SCORZONI et al. 2016). Estudos recentes têm demonstrado o uso de óleos essenciais com potencial atividade antifúngica em isolados de *Candida* spp. resistentes aos medicamentos clínicos. Como exemplos desses óleos essenciais podemos citar aqueles extraídos do *Allium sativum* L. (MENDOZA-JUACHE, 2017), *Eucalyptus citriodora* Hook (PATTNAIK; SUBRAMANYAM; KOLE, 1996), *Origanum vulgare* L. (PRADEBON BRONDANI et al.,

2018); *Cinnamomum cassia* L. e *Pelargonium graveolens* L'Her (DOS SANTOS et al., 2020; GUCWA et al., 2018).

O óleo de *Pelargonium graveolens* L'Her (gerânio) tem demonstrado atividade antifúngica em estudos prévios pelo nosso grupo de pesquisa (DOS SANTOS et al., 2020). Seu óleo é obtido através da hidrodestilação das partes aéreas e apresenta um rendimento de 1,0 a 1,3 %, sendo, portanto, um recurso viável e renovável (BLANK et al., 2012). Seu constituinte principal é o geraniol (SWEETMAN, 2011) o qual tem comprovada atividade antifúngica (BARD et al., 1988; LEITE et al., 2015). O óleo essencial de *Cinnamomum cassia* L. (canela-da-india) possui atividade antimicrobiana, inibindo o crescimento de bactérias como o *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* e *Proteus vulgaris*, fungos filamentosos e a *Candida* spp. (OOI et al., 2006). Seu óleo pode ser extraído de folhas ou ramos jovens e é constituído predominantemente por trans-cinamaldeído, possui um rendimento mínimo de 1% (FARMACOPEIA, 2010). O óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr.& Perry (cravo) é obtido por hidrodestilação, a partir de botões florais secos, e é constituído majoritariamente por eugenol (FARMACOPEIA, 2010). Seu óleo possui atividade antifúngica frente a *Candida* spp. (DOS SANTOS et al., 2020; FERRÃO et al., 2020), *Aspergillus* spp. e espécies de dermatófitos (PINTO et al., 2009). O óleo essencial de *Myristica fragrans* Houtt (noz-moscada) é constituído principalmente por pineno, canfeno, mirceno, limoneno, terpinoleno, miristicina, safrol, sabineno, terpineol, eugenol e elimicina (MARGARET; NEERAJA, 2016) e possui atividade antioxidantes e antimicrobiana (BUTZGE et al., 2020; FERRÃO et al., 2020; PERIASAMY et al., 2016).

Considerando o gênero *Candida* um patógeno oportunista em infecções na mucosa oral, bem como sua variabilidade no perfil de suscetibilidade das espécies, o presente estudo visa avaliar o perfil de suscetibilidade antifúngica, capacidade de adesão e formação de biofilme dos isolados de *Candida* spp. Identificados por MALDI-TOF MS, bem como verificar a atividade antifúngica e antibiofilme dos óleos essenciais de *Pelargonium graveolens* L'Her, *Cinammomum cassia* L., *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perrye *Myristica fragrans* Houtt frente a estes isolados.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o perfil de suscetibilidade, capacidade de adesão e formação de biofilme dos isolados clínicos de *Candida* spp. da cavidade oral de pacientes usuários de prótese dentária, previamente identificados por MALDI-TOF MS, bem como, verificar a atividade antifúngica, antibiofilme e hemolítica dos óleos essenciais de *Pelargonium graveolens* L'Her, *Cinammomum cassia* L., *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry e *Myristica fragrans* Houtt.

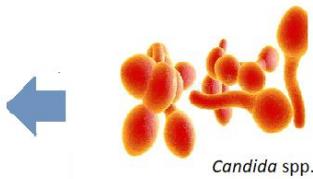
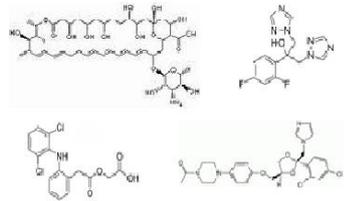
2.2. Objetivos Específicos

1. Avaliar a prevalência das espécies de *Candida* spp. em mucosa oral dos pacientes avaliados e relacionar com seus hábitos e características;
2. Determinar o perfil de suscetibilidade antifúngica das espécies de *Candida* spp., isoladas da mucosa oral dos pacientes estudados, para o fluconazol, itraconazol, cetoconazol e nistatina
3. Determinar a capacidade de aderência das espécies de *Candida* spp. em célula epitelial oral;
4. Avaliar a capacidade de formação de biofilme pelos isolados clínicos;
5. Avaliar a atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Pelargonium graveolens* L'Her, *Cinammomum cassia* L., *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry e *Myristica fragrans* Houtt frente a estes isolados de *Candida* spp.;
6. Verificar a atividade antibiofilme dos óleos essenciais de *Pelargonium graveolens* L'Her, *Cinammomum cassia* L., *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry e *Myristica fragrans* frente aos isolados de *Candida* spp.;
7. Avaliar a atividade hemolítica dos óleos essenciais de *Pelargonium graveolens* L'Her (Geranaceae), *Cinammomum cassia* L., *Syzygium aromaticum* (L.) Merr & Perry e *Myristica fragrans* Houtt
8. Identificar os isolados clínicos de *Candida* spp. através de MALDI-TOF MS e verificar o perfil da impressão- MS digital destes isolados.

3. MAPA CONCEITUAL DO ESTUDO



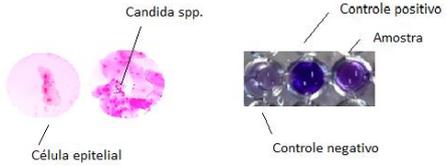
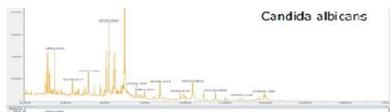
Prospecção antifúngica de óleos essenciais de plantas medicinais frente a isolados clínicos de *Candida* spp. diagnosticados em pacientes do Hospital de odontologia da UFRGS



Prevalência e perfil de suscetibilidade

Capacidade de adesão e formação de biofilme

Avaliação do perfil de impressão digital MALDI - TOF MS de espécies de *Candida*



Avaliação da atividade antifúngica

Avaliação da atividade antibiofilme



4.1. Candidíase

Candida é uma levedura que faz parte da microbiota do corpo humano colonizando a pele, cavidade oral e as mucosas do trato genital, gastrointestinal e urinário. O gênero *Candida* contém centenas de espécies heterogêneas, mas apenas uma minoria tem sido implicada em infecções fúngicas (CADAVID et al., 2020; GARCIA-CUESTA; SARRION-PEREZ; BAGAN, 2014).

As principais espécies de interesse clínico são a *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; NAKAMURA; CALDEIRA; AVILA, 2013), *C. glabrata*, *C. krusei*, (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; LYON et al., 2008a) *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae* (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003). Entretanto, um número progressivo nos casos de doenças superficiais e invasivas relacionadas as espécies emergentes de *Candida* spp. têm sido descritos, envolvendo isolados de *C. dubliniensis* (AL-AHMAD et al., 2016; GHESHLAGHI; HELWEG-LARSEN, 2020), *C. kefyr*, *C. rugosa* (MICELI; DÍAZ; LEE, 2011; MLOKA; BWIRE; MWAMBETE, 2020), *C. famata* (EMMANUEL et al., 2020), *C. palmiroleophila* (CASAGRANDE PIERANTONI et al., 2020) *C. utilis*, *C. lipolytica*, *C. norvegensis*, *C. inconspícua*, entre outras (SONG et al., 2020).

A incidência de *Candida* spp. isoladas da cavidade oral tem sido reportada em diferentes grupos de indivíduos, 25% em crianças saudáveis (SILVA et al., 2015), 30% em adultos saudáveis (ABU-ELTEEN; HAMAD; SALAH, 2006), 60 % em pessoas acima dos 65 anos de idade (PRAKASH et al., 2015), 60% em usuários de próteses dentárias removíveis (MARCOS-ARIAS, et al., 2009); 55-58% em pacientes diabéticos (ABU-ELTEEN; HAMAD; SALAH, 2006; MARTINEZ et al., 2013a) 70-80% em pacientes em tratamento quimioterápico (JAIN et al., 2016; ASLANI et al., 2018) e 62-72% nos pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (DELGADO et al., 2009; LOURENÇO et al., 2017). A espécie mais prevalente tem sido a *C. albicans*, seguida de *C. tropicalis*, *C. guilhermondii*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, todas associadas a micoses orais (MARCO-ARIAS et al., 2009). A presença de *Candida* spp. na mucosa oral não implica necessariamente em patogenicidade, entretanto, sob determinadas condições, comportam-se como patógenos oportunistas, produzindo infecções que vão desde lesões superficiais da mucosa até disseminações sistêmicas graves e invasivas (CARPIO et al., 2009; AL-AHMAD et al., 2016).

Lyon e colaboradores (2006), em Minas Gerais, avaliaram a presença de *Candida* spp. na cavidade oral em 112 usuários de prótese e 103 indivíduos com dentição natural. Neste estudo concluíram que os fatores como gênero, idade acima de 60 anos, baixa educação e xerostomia estão diretamente associados com a presença da *Candida* spp. na cavidade oral. O uso de prótese foi considerado o fator predisponente para a presença da levedura. Sendo que, entre as espécies, a *C. albicans* foi a mais prevalente (65,1%), seguido de *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis* (LYON et al., 2006).

Arias e colaboradores (2009) realizaram um estudo com 100 pacientes usuários de prótese, com e sem estomatite protética, revelando que 53% dos pacientes com a estomatite protética estavam colonizados por espécies de *Candida* spp. e a *C. albicans* foi identificada na maioria dos casos (73,4%), seguido de *C. glabrata* e *C. tropicalis* (8,9%). As demais espécies isoladas foram *C. famata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* e *C. dubliniensis*. Nos pacientes saudáveis também a *C. albicans* foi a espécie predominante (58,9%), seguida por *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* (MARCOS-ARIAS et al., 2009). Em outro estudo reportado por Leite e colaboradores (2015) com 46 pacientes portadores de estomatite protética atendidos na Universidade Federal de Odontologia do Sergipe corroboram com a ocorrência de *C. albicans* como a espécie mais prevalente, tanto na mucosa do palato (36,5%) como na superfície da prótese, 53,3% (LEITE; PIVA; MARTINS FILHO, 2015).

A candidíase, na maioria das vezes, tem origem endógena, ocorrendo como consequência do rompimento do equilíbrio parasita-hospedeiro, desencadeado por alterações na barreira tecidual e na microbiota autóctone ou pelo comprometimento das defesas naturais e imunológica (CHEN; PLAYFORD; SORRELL, 2010). Fatores ligados ao hospedeiro têm sido relacionados como facilitadores para o desenvolvimento de infecções fúngicas na cavidade oral, entre eles o diabetes mellitus (ABU-ELTTEN; HAMAD; SALAH, 2006; ZOMORODIAN et al., 2016); síndrome de *Cushing*, malignidades, condições imunossupressoras, tabagismo e utilização de próteses dentárias (AKPAN; MORGAN, 2002; BADIEE; ALBORZI; JOUKAR, 2011; GARCIA-CUESTA; SARRION-PEREZ; BAGAN, 2014).

Além destes fatores relacionados ao hospedeiro, existem algumas propriedades inerentes ao fungo, denominadas fatores de virulência, que se

caracterizam por uma série de estratégias específicas para se estabelecer, colonizar e causar a doença fúngica superando os mecanismos de defesas do hospedeiro (MAYER; WILSON; HUBE, 2013; BADIEE; HASHEM CHEN; PLAYFORD; SORRELL, 2010; IZADEH, 2014).

Os principais fatores de virulência são a capacidade de expressão de enzimas extracelulares, fosfolipases e proteinases, que degradam os tecidos do hospedeiro; produção de substâncias tóxicas que causam lesão celular; capacidade de adesão a células e tecidos; formação de biofilmes sobre células e superfícies inanimadas; produção de tubo germinativo por algumas espécies de *Candida* spp.; produção de hemolisinas; hidrofobicidade da superfície celular e resistência ao peróxido de hidrogênio (GÁCSER et al., 2007; Mayer; Wilson; HUBE, 2013; BADIEE; HASHEMIZADEH, 2014; SILVA; NERY; DIAS, 2014; CANELA et al., 2018).

O processo inicial de virulência do gênero *Candida*, por exemplo, da espécie *C. albicans* é a sua adesão às células do hospedeiro. Essa ação é de fundamental importância para que o fungo sobreviva aderido ou internalizado pelas células epiteliais. Entre os mecanismos pelos quais um fungo adere e mantém contato com a superfície hospedeira, estão os não específicos, tais como interações iônicas e hidrofóbicas e o reconhecimento específico entre ligantes e receptores. O fungo *C. albicans* possui uma família de genes *Agglutinin-Like Sequence* (Als) que codifica glicoproteínas de superfície celular relacionadas ao processo de adesão às mucosas (MURCIANO et al., 2012; HOYER; COTA, 2016). Entretanto, as proteínas Als não foram identificadas em todas as espécies de *Candida* spp. e, provavelmente, nestas espécies, outros polipeptídios diferentes possam exercer a função de aderência (SILVA et al., 2011), como a Epa1p em *C. glabrata* (SUNDSTROM, 2002).

A capacidade das espécies de *Candida* spp. em se diferenciarem da forma unicelular leveduriforme para produzir pseudo-hifas e excepcionalmente hifas representa uma resposta adaptativa do fungo para sobreviver em condições biológicas diversificadas de pH e temperatura (KARKOWSKA-KULETA; RAPALA-KOZIK; KOZIK, 2009). Essas mudanças fenotípicas deste fungo são importantes, principalmente, no processo de invasão ao hospedeiro, pois eleva a capacidade de adesão pelo aumento da superfície de contato tornando o fungo mais virulento durante os processos infecciosos (KARKOWSKA-KULETA et al., 2009).

Outros fatores envolvidos na transição da forma comensal para patogênica destacam-se a proteção contra lise osmótica (parede celular) e liberação de enzimas extracelulares que facilitam com que a *Candida* spp. atravesse o epitélio do hospedeiro (CALDERONE; FONZI, 2001; KARKOWSKA-KULETA et al., 2009). As principais enzimas produzidas são as proteinases e as fosfolipases. As fosfolipases lizam a membrana fosfolipídica das células do hospedeiro e as proteinases degradam colágeno, queratina e peptídeos localizados na superfície de mucosas, podendo ainda, atuar sobre componentes do sistema imunológico, como imunoglobulinas, complemento e citocinas, facilitando a invasão das leveduras aos tecidos do hospedeiro (KUMAR et al., 2006; MARCOS-ARIAS et al., 2011).

Um importante mecanismo de virulência é a sua versatilidade de adaptação e capacidade de formar comunidades microbianas aderidas a superfícies, as quais são denominadas de biofilmes. O biofilme é uma massa microbiana altamente estruturada, irreversivelmente aderida a um substrato ou interface e embebidas em uma matriz extracelular de substâncias poliméricas que as próprias células produzem (DONLAN; COSTERTON, 2002; SANTANA et al., 2013; SHANKAR RAUT; MOHAN KARUPPAYIL, 2016). Os microrganismos ao se organizarem nestas comunidades alcançam um crescimento mais ordenado com melhor capacidade de captação de nutrientes e maior proteção contra radiações UV, fagocitose, desidratação e resistência aos antifúngicos (SANTANA et al., 2013).

4.2. Tratamento da candidíase oral

A presença de biofilme, a resistência intrínseca à terapia antifúngica observada em algumas espécies de *Candida* spp. e o desenvolvimento de resistência durante o tratamento tem dificultado o manejo terapêutico na candidíase oral (GOULART et al., 2018).

O tratamento convencional abrange três classes farmacêuticas de antifúngicos, os poliênicos, os azólicos e as equinocandinas. Os poliênicos mais utilizados são a nistatina (Micostatin®) e a anfotericina B (Anforicin B®). Esta classe de fármacos apresenta alta toxicidade e falta seletividade para o hospedeiro. A nistatina e anfoterina B são fármacos sintéticos bastante utilizados em casos de infecção por candidíase oral. A forma farmacêutica mais utilizada para este tipo de patologia é a suspensão oral, mas também podem ser encontrados em formas farmacêuticas como

comprimidos e pastilhas. Ambos possuem o mesmo mecanismo de ação, agem formando um complexo do antifúngico com a membrana plasmática do fungo, devido a sua interação com o ergosterol, formando canais na membrana plasmática, ocorrendo assim um extravasamento de seu conteúdo celular, mudando a sua conformação, e levando a morte da célula fúngica (CARRILLO-MUNOZ et al., 2006; KATHIRAVAN et al., 2012; STEFANOVIC et al., 2013; BARBOSA; FARIA, 2014; LEE; LEE, 2018).

Os antifúngicos azólicos, assim como a nistatina, são bastante utilizados por apresentar amplo espectro de ação. Estão organizados em duas subclasses de acordo com sua estrutura química. A primeira subclasse compreende os imidazólicos, caracterizados por um anel pentagonal com três átomos de carbono e dois de nitrogênio (cetoconazol-Nizoral®, clotrimazol- Canesten® e miconazol-Daktarin®) e a segunda subclasse, os triazólicos (fluconazol-Zoltec® e itraconazol-Sporanox®) abrange os compostos com dois átomos de carbono e três de nitrogênio (BARBOSA; FARIA, 2014; NETT; ANDES, 2016). Estes compostos atuam mediante a inibição da enzima lanosterol 14- α demetilase no complexo citocromo P-450 dos fungos. A sua inativação inibe a conversão do lanosterol em ergosterol, levando ao acúmulo de seus precursores, ocasionando a perda da integridade da membrana fúngica, importante para a sobrevivência da célula (BELENKY et al., 2013; CHEN et al., 2018; DELATTIN et al., 2014; LEE; LEE, 2018). Possuem uma boa biodisponibilidade quando administrados por via oral. Os fármacos mais indicados, dentro da classe dos azóis, para tratamento na candidíase oral, são fluconazol, cetoconazol e itraconazol, presentes na forma de pomadas, cremes, soluções, pós e preparações orais (BARBOSA; FARIA, 2014).

As equinocandinas (caspofungina, Cancidas®), micafungina (Prograf®) e anidulafungina (Ecalta®) são lipopeptídeos semi-sintéticos obtidos a partir dos fungos *Coleophoma empetri* e *Glarea lozoyensi* (KATHIRAVAN et al., 2012). Atualmente, representam a terapia de primeira escolha para candidíase invasiva, incluindo aqueles isolados resistentes aos azólicos (PAPPAS et al., 2015). As equinocandinas atuam inibindo a síntese de glicanos na parede celular através de inibição não competitiva da enzima 1,3- β glicano (CORTÉS; RUSSI, 2011). O bloqueio de sua síntese resulta em desequilíbrio osmótico, prejudicando a viabilidade dos microrganismos. Esses antifúngicos são seguros, bem tolerados e têm poucas interações medicamentosas

(LEE; LEE, 2018).

O tratamento da candidíase oral segundo Guideline for the Management of Candidiasis (2016) é realizado com nistatina tópica, enquanto os outros antifúngicos, como fluconazol e itraconazol são indicados principalmente quando o tratamento tópico falhou (GARCIA-CUESTA; SARRION-PEREZ; BAGAN, 2014; MIRANDA-CADENA et al., 2018). Em casos severos de candidíase orofaríngea faz-se o uso de voriconazol- Vfend®, anfotericina B ou das equinocandinas (PAPPAS et al., 2015). A nistatina, fluconazol, cetoconazol e anfotericina B fazem parte da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais – RENAME (2017). A maioria das espécies de *Candida* spp. demonstram boa susceptibilidade frente ao miconazol, flucanazol e cetoconazol, observando-se que a *C. glabrata* é a menos susceptível e a *C. krusei* apresenta resistência intrínseca ao fluconazol (KATHIRAVAN et al., 2012; MIRANDA-CADENA et al., 2018). A susceptibilidade reduzida de *C. glabrata* aos azóis tem sido um problema no tratamento de infecções causadas por esta espécie (MIRANDA-CADENA et al., 2018). Assim, a identificação rápida e precisa da espécie fúngica é necessária para o início precoce da terapia antifúngica (CLARK et al., 2013).

4.3 Identificação das espécies

A identificação de uma levedura pode ser feita através de estudos morfológicos, cultivo em meio cromogênico, métodos baseados na assimilação ou fermentação de carboidratos, testes enzimáticos, sistemas automatizados ou identificação por métodos moleculares (CLARK et al., 2013). Os métodos convencionais são baseados em características morfológicas e fisiológicas. O teste do tubo germinativo é um procedimento simples, econômico e eficiente para diferenciar *C. albicans* de outras espécies de *Candida* spp., e se baseia na formação de estruturas semelhantes a tubos (denominadas tubos germinativos) de *C. albicans* dentro de 2 a 4 horas a 30°C quando incubadas em soro humano ou de animal (BEHESHTI; SMITH; KRAUSE, 1975; NEPPELENBROEK et al., 2014). Algumas espécies de *Candida* não-*albicans* também podem gerar tubo germinativo ou pseudo-hifas, como por exemplo *C. tropicalis*, sendo necessário outros testes confirmatórios (LÓPEZ et al., 2005; SINGH; PARIJA, 2012). Outra técnica de identificação destas espécies é a formação de clamidoconídios. Espécies como a *C. albicans* e *C. dublinensis* e alguns isolados de *C. tropicalis* em condições de depleção dos

nutrientes formam clamidoconídios (BEHESHTI; SMITH; KRAUSE, 1975; NEPPELENBROEK et al., 2014).

A assimilação de fonte de carbono é um método importante para diferenciação das leveduras e se fundamenta na capacidade de um isolado assimilar um carboidrato específico como a única fonte de carbono. A popularidade desse teste pode ser atribuída à simplicidade do método e ao baixo custo (DEVADAS et al., 2017). Os testes de fermentação, geralmente são realizados em meios líquidos e baseiam-se na demonstração da produção de gás. Embora a fermentação de carboidratos seja um teste útil para diferenciar as espécies de *Candida* spp., este é considerado menos sensível e, portanto, menos confiável do que o teste de assimilação de carboidratos (NEPPELENBROEK et al., 2014).

Vários sistemas de diagnóstico simplificados foram desenvolvidos com base nos testes convencionais como, formação de clamidósporos e testes de assimilação de açúcares. Esses testes podem ser realizados de forma manual, como os kits API 20C AUX (BioMérieux®) e Candifast (International Microbio®) ou em uma plataforma automatizada como ID 32 C (BioMérieux™) para identificação das principais leveduras de importância clínica (MALUCHE; SANTOS, 2008; NEPPELENBROEK et al., 2014).

Os meios cromogênicos são também utilizados para o isolamento e identificação diferencial de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. Krusei*, após 24-48h de incubação a 30°C. As espécies são identificadas pela coloração e aparência das colônias resultantes da clivagem dos substratos cromogênicos (β -N-acetilhexosaminidase) por enzimas específicas de cada espécie (PINCUS; ORENGA; CHATELLIER, 2007). Uma vantagem desta técnica é a detecção de culturas mistas (FREYDIERE; GUINET; BOIRON, 2001). No entanto, espécies de *Candida* não-*albicans* como a *C. famata*, *C. firmetaria*, *C. guilliermondii*, *C. inconspicua*, *C. kefyr*, *C. lipolytica*, *C. lusitaniae*, *C. norvegensis* e *C. parapsilosis*, produzem tons variáveis de marfim, para os isolados da mesma espécie (NEPPELENBROEK et al., 2014; PINCUS; ORENGA; CHATELLIER, 2007).

Nos métodos moleculares se reconhecem uma sequência específica de aminoácidos através de fragmentos do DNA, para a identificação de cada espécie. A amplificação do espaçador transcrito interno ITS1/ITS2 do rDNA é considerado o padrão-ouro nos métodos de identificação molecular. Está baseado na amplificação dos fragmentos de rDna das regiões (18S, 28S ou 5.8S) que flanqueiam ITS-1 ou ITS-

2. Estes fragmentos posteriormente são analisados pelo polimorfismo no comprimento (ZHANG et al., 2016). O processo de amplificação pode ser monitorado através do uso de sondas marcadas, que hibridizam especificamente as moléculas de amplicon recém-formadas, aumentando a especificidade da *Polymerase Chain Reaction* - PCR (ZHANG et al., 2016). Ele permite discriminar espécies ou variedades de uma mesma espécie (CLARCK et al., 2013). No entanto, essa metodologia é demorada e cara para uso em rotina de diagnóstico clínico (NEPPELENBROEK et al., 2014).

Como alternativa a identificação bioquímica e molecular, vem sendo utilizada a espectrometria de massas através de ionização por dessorção à laser assistida por matriz e a detecção em analisador do tipo tempo de voo (MALDI-TOF) na identificação rotineira de microrganismos, especialmente bactérias e leveduras, nos centros clínicos em várias partes do mundo (LIMA-NETO et al., 2014; VAN VEEN; CLAAS; KUIJPER, 2010). A tecnologia MALDI-TOF (Matrix Associated Laser Desorption-Ionization-Time of Flight) facilita a identificação de um grande espectro de proteínas diretamente dos microrganismos intactos (LIMA-NETO et al., 2014; VAN VEEN; CLAAS; KUIJPER, 2010).

A amostra para análise por MALDI-TOF MS é revestida por uma solução de composto orgânico de massa molar conhecida, chamado matriz (SINGHAL et al., 2015). A matriz atua como um suporte, fornecendo prótons para a ionização do material clínico (CLARK et al., 2013). O cristal de matriz da amostra é então irradiado com um feixe de laser UV por um curto período de tempo, gerando íons protonados a partir de analitos na amostra (CLARK et al., 2013). Os íons protonados são acelerados com um potencial fixo, onde eles se separam com base na sua razão massa/carga (m/z) e são detectados e medidos através de analisadores de tempo de voo (TOF). Utilizando MALDI-TOF, a razão m/z de um íon é medida através da determinação do tempo necessário para que o íon percorra o comprimento do tubo. Desta forma, os íons leves chegam antes e os íons pesados levarão mais tempo para percorrer o tubo. Alguns analisadores de TOF incluem um espelho de íons na extremidade traseira do tubo de voo, que serve para refletir estes íons encaminhando a outro detector. Assim, o espelho de íons não apenas aumenta o comprimento do tubo de voo, mas também corrige pequenas diferenças de energia entre os íons (CLARK et al., 2013; SINGHAL et al., 2015; YATES, 1998). Com base nas informações do TOF, é gerado um espectro

característico denominado impressão digital em massa peptídica (PMF) para analitos na amostra, conforme a Figura 1 (SINGHAL et al., 2015).

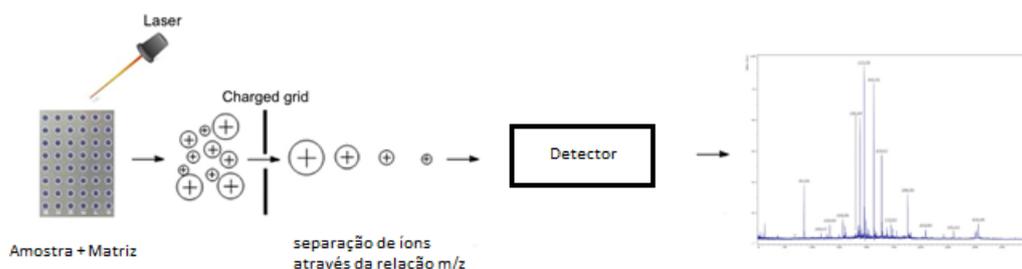


Figura 1: Diagrama esquemático mostrando o funcionamento do MALDI-TOF MS (SINGHAL et al., 2015).

O espectro gerado é analisado como um perfil proteômico individual com massa molecular variando de 2000 a 20000, onde aparecem importantes proteínas ribossômicas que são utilizadas como biomarcadores (LIMA-NETO et al., 2014; SANTOS et al., 2011). Considerando a massa atômica (Da), as regiões mais importantes para a identificação de *Candida* spp. de 5000 a 7000 Da, e a região de 11000 Da para a identificação de *C. glabrata* e *C. braccarensis*, conforme Figura 2: Exemplos representativos de espectros de leveduras analisados por MALDI-TOF MS (SANTOS et al., 2011)., (SANTOS et al., 2011).

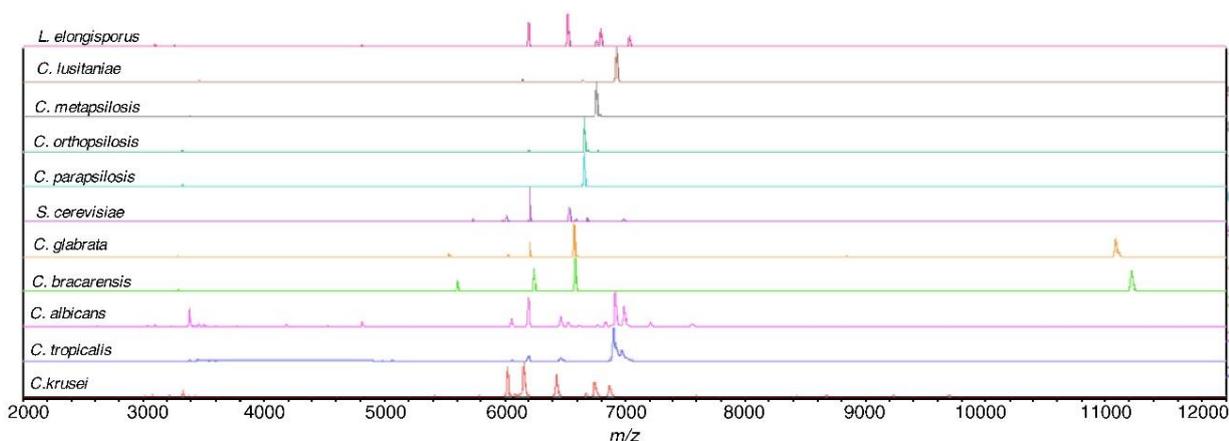


Figura 2: Exemplos representativos de espectros de leveduras analisados por MALDI-TOF MS (SANTOS et al., 2011).

O desempenho do MALDI-TOF MS na identificação de leveduras de interesse médico é muito satisfatório, com taxas de identificação acima de 90% na maioria dos estudos, superando assim os métodos tradicionais de identificação devido à sua precisão, ganho de tempo e baixo custo de reagente (CASSAGNE et al., 2016). Mancini e colaboradores (2013) em seu estudo avaliaram as taxas de identificação corretas de leveduras a nível de espécie pelo MALDI-TOF Bruker Biotyper MS (BMS) e o Vitek MS (VMS) obtendo taxas de (89,8% versus 84,3%) usando as bases de dados comerciais e (100% versus 84,3%) usando um banco de dados estendido do MALDI-TOF (MANCINI et al., 2013). Relloso e colaboradores (2015) obtiveram em seu estudo um índice de 96,5 % das identificações corretas a nível de espécie (RELLOSO et al., 2015). Em outro estudo, 99,0% dos 192 isolados clínicos de leveduras foram identificadas corretamente pelo MALDI-TOF MS (STEVENSON et al., 2010). Na identificação de leveduras, as análises feitas por extração com etanol, ácido fórmico e acetato obtiveram os melhores índices de identificação a nível de espécie (CASSAGNE et al., 2013).

Estudos recentes têm utilizado o MALDI-TOF também para a detecção rápida de resistência antifúngica. Vatanshenassan e colaboradores (2018), avaliaram a susceptibilidade de *C. albicans* e *C. glabrata* frente a caspofungina pelo método MBT ASTRA, técnica semi-quantitativa baseada em MALDI-TOF, projetada para testes rápidos de susceptibilidade em bactérias (VATANSHENASSAN et al., 2018). Em outro estudo Roberto e colaboradores (2020) avaliaram a resistência de *C. parapsilosis* por MALDI-TOF frente a equinocandinas e obtiveram concordância de 95% para anidulafungina e caspofungina, além de 100% para micafungina quando comparados com CLSI M27 A3 de 2008 (ROBERTO et al., 2020).

4.4. Resistência antifúngica

A resistência antifúngica pode ser classificada como microbiológica ou clínica, ou ambas. A resistência microbiológica refere-se a não susceptibilidade do microrganismo a um agente antifúngico determinada pelo teste de susceptibilidade *in vitro*. A resistência microbiológica pode ser primária (intrínseca) ou secundária (adquirida), Figura 3. A resistência primária ocorre naturalmente sem a exposição ao antifúngico e a secundária é desenvolvida após a exposição ao fármaco, como por exemplo a resistência de *C. albicans* ao fluconazol (PFALLER, 2012; ZEINA; JOHN,

2008). A resistência clínica é definida como a incapacidade de erradicar uma infecção fúngica, apesar da administração de um agente antifúngico com atividade *in vitro* contra o microrganismo testado. Tais falhas podem ser atribuídas a uma combinação de fatores relacionados ao hospedeiro, ao agente antifúngico ou ao patógeno (PFALLER, 2012). Os mecanismos moleculares que causam resistência antifúngica são complexos. As estratégias de sobrevivência molecular incluem mutações de alvos em drogas que reduzem a sua afinidade, super expressão de proteínas alvo, transportadores de membrana de efluxo e degradação da droga (PARENTE-ROCHA et al., 2017; LEE; LEE, 2018).

A resistência a poliênicos é rara, no entanto já foi verificado a resistência intrínseca de alguns isolados de *C. lusitanae*, *C. lipolytica* e *C. guilhermondii*. Esta resistência pode ser causada por uma redução da quantidade de ergosterol na membrana plasmática, o que acarreta uma menor afinidade entre o antifúngico e a membrana (LOEFFLER; STEVENS, 2003). Um estudo com isolados de *C. lusitanae* resistentes a anfotericina B constatou redução *na expressão do gene* ERG3 e menor teor de ergosterol, evidenciando que a mutação ou a expressão alterada de genes envolvidos na biossíntese do ergosterol podem conduzir resistência a anfotericina B (YOUNG; HULL; HEITMAN, 2003).

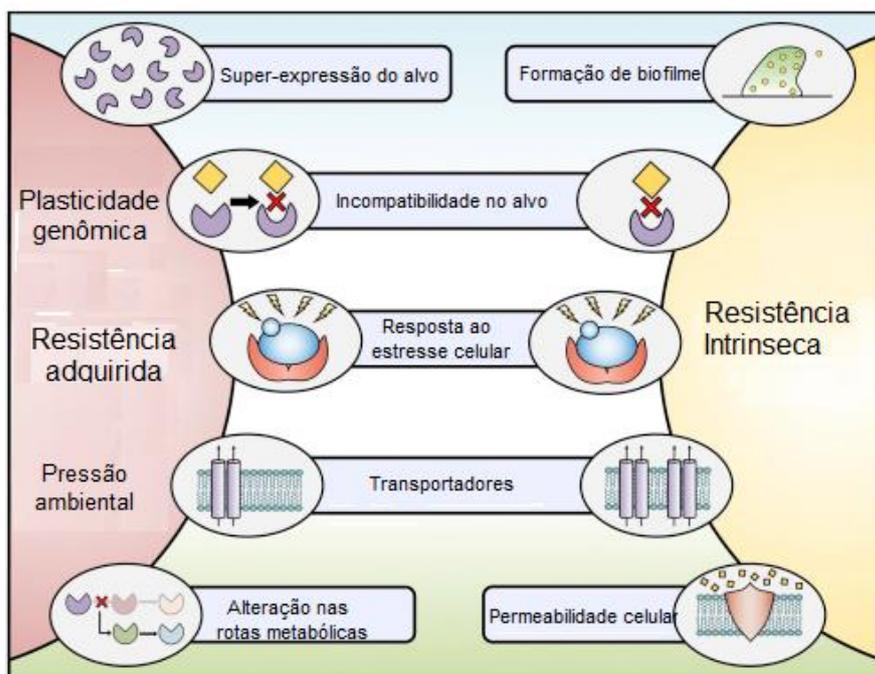


Figura 3: Relações e os mecanismos da resistência intrínseca e adquirida (REVIE et al., 2018).

A alteração na composição da membrana causada pelo aumento de esfingolipídios pode ocasionar a resistência a anfotericina B. Os esfingolipídios são necessários em vários processos celulares, incluindo a manutenção da integridade da membrana plasmática e o bom funcionamento de certas proteínas da membrana. O aumento do teor de esfingolipídios na membrana pode afetar positivamente o funcionamento de bombas de efluxo, bem como, na oferta de sítio de ligação da anfotericina B, uma vez que o aumento destes acarretará numa diminuição do teor de ergosterol (SHARMA et al., 2014). Por fim, outro mecanismo de resistência reportado em poliênios é o da redução da sensibilidade ao antifúngico, pelo aumento da atividade da catalase e da superóxido dismutase quando exposto ao fármaco em resposta adaptativa ao estresse oxidativo (LINARES et al., 2013).

Os mecanismos de resistência aos azóis são as mutações no gene ERG 3 e/ou ERG11, sobre-expressão do gene ERG 11 e sobre-expressão de transportadores das membranas de efluxo, Figura 4 (MARICHAL et al., 1999; REVIE et al., 2018; VIEIRA; SANTOS, 2017; ZHOU et al., 2018). Os genes ERG11 e ERG3 codificam proteínas envolvidas na biossíntese do ergosterol, e mutações em pontos específicos desses dois genes podem gerar resistência aos azóis (ZHOU et al., 2018). A alteração ou sobre-expressão do gene ERG11, modifica ou aumenta a quantidade de sítios ativos da enzima 14 alpha-demethylase (envolvida na biossíntese dos esteróis) para o fármaco, reduzindo a atividade deste e levando à resistência (BENEDETTI et al., 2019; MARICHAL et al., 1999). As mutações no ERG3 levam ao esgotamento do ergosterol e ao acúmulo de esteróis alternativos (14 α -metilfecosterol), geralmente resultando em resistência cruzada aos azóis e polienos (COWEN et al., 2015; ZHOU et al., 2018). A resistência ao azol mediada por ERG3 depende intimamente dos principais reguladores da resposta ao estresse, como a proteína fosfatase calcineurina, a proteína cinase Pkc1, a chaperona molecular Hsp90 (REVIE et al., 2018). A capacidade de *C. glabrata* em substituir ergosterol por esterol na membrana do hospedeiro pode ser responsável por sua elevada resistência aos azóis (BARD et al., 2005).

A resistência adquirida aos azólicos pode estar envolvida com o aumento da expressão de transportadores farmacológicos, ocasionando o efluxo dos fármacos nas células fúngicas (ROGERS, 2006). Os principais tipos de transportadores citados na literatura são o *Major Facilitor Superfamily* (MFS) que fazem parte da família de

proteínas transportadoras de membrana codificada pelo gene MDR as quais estão envolvidas apenas na resistência ao fluconazol e nos transportadores ATP binding cassette (ABC), codificados pelos genes CDR1 e CDR2, envolvidos no transporte de todos os derivados azólicos (CUENCA-ESTRELLA et al., 2006; PARENTE-ROCHA et al., 2017; POURAKBARI et al., 2017). Li e colaboradores (2015) observaram a importância das histonas desacetilases (enzimas que atuam na desacetilação de lisinas em histonas, fatores de transcrição, proteínas de transdução de sinal e outras proteínas celulares) no desenvolvimento de resistência aos azólicos em *C. albicans*. A desacetilação de histona pode levar à alterações nas proteínas transportadoras das bombas de efluxo (LI et al., 2015), Figura 4.

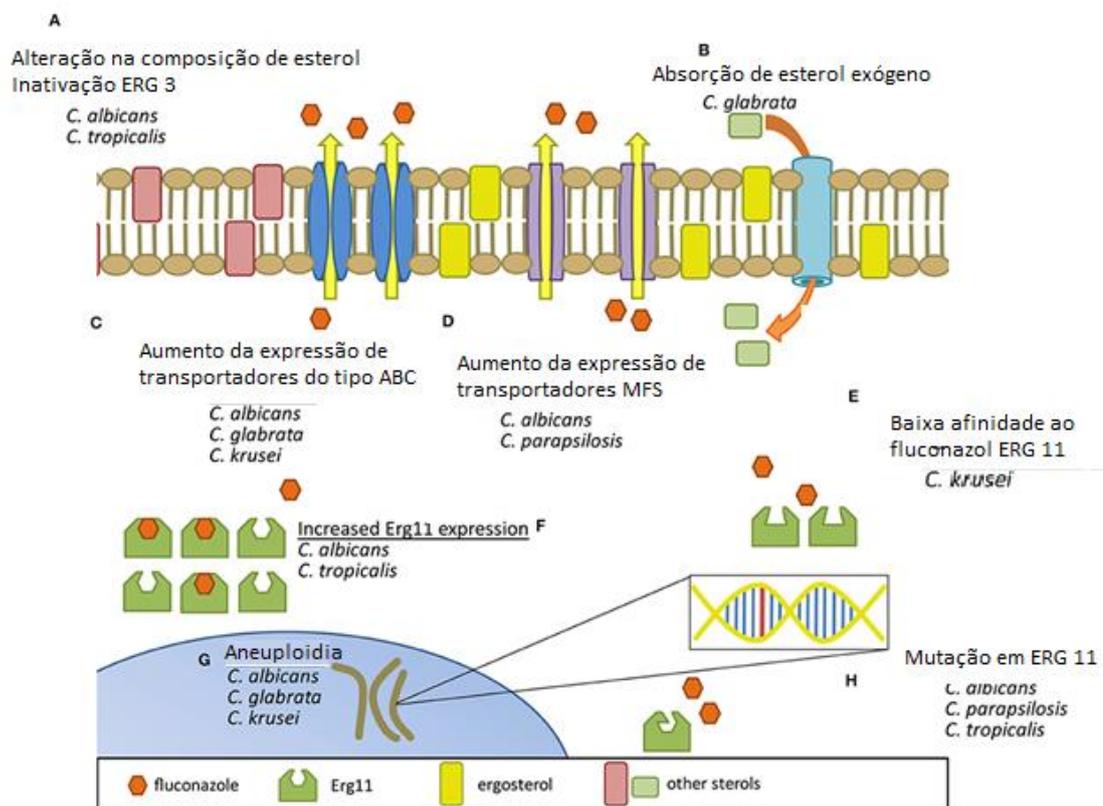


Figura 4: Mecanismos de resistência antifúngica em *Candida* spp. (WHALEY et al., 2017). A) Alteração da composição de esterol e inativação de ERG 3; B) Captação de esterol exógeno; C) Aumento da expressão de transportadores ABC; D) Aumento da expressão de transportadores MFS; E) Baixa afinidade ao fluconazol pela mutação em ERG 11; F) Aumento da expressão de ERG 11; G) Aneuploidia H) Mutação em ERG 11.

Outro fator associado a resistência aos azóis é a aneuploidia, que consiste em alterações genéticas no número de cromossomos. Os rearranjos cromossômicos que resultam no aumento do número de cromossomas são os mais predominantes de resistência adquirida ao antifúngico fluconazol em *C. albicans*. Um aneuploide específico, isocromossomo 5L, que é composto por duas cópias do braço esquerdo de Chr5, ocorre com alta frequência e é detectável logo após a exposição ao fluconazol (SELMECKI et al., 2009). Este isocromossomo, carrega genes que expressam a enzima 14alpha-demethylase, e um fator de transcrição que positivamente regula um subconjunto de genes da bomba de efluxo, aumento e reduções no isocromossomo, acarretam alteração no perfil de susceptibilidade ao fluconazol (SELMECKI; FORCHE; BERMAN, 2006; SELMECKI; NEJAD; PAULSON, 2008).

O mecanismo de resistência a equinocandinas encontrado em isolados de *Candida* spp. envolve a ocorrência de mutações pontuais no gene Fks1 e Fks2, resultando em alterações conformacionais na enzima glucano sintase, diminuindo assim a afinidade do fármaco pela enzima. O aumento da síntese de quitina também tem sido descrito como um importante mecanismo de resistência. Isolados de diversas espécies de *Candida* spp. quando expostos a baixas concentrações de equinocandinas induzem a expressão de genes que codificam a síntese de quitina, aumentando sua concentração na parede celular provocando uma diminuição na atividade do antifúngico (COWEN et al., 2015; LEE; LEE, 2018).

Um outro mecanismo importante de resistência é a formação de biofilmes. Os mecanismos responsáveis pela resistência aos antifúngicos estão relacionados com limitações na difusão do agente antimicrobiano pela matriz extracelular, alterações fenotípicas das células no biofilme ou a alteração no seu genótipo. Outro mecanismo proposto para a resistência aos agentes antimicrobianos são as células associadas ao biofilme que crescem mais lentamente do que seus homólogos planctônicos e, como consequência, tem sua velocidade de captação dos agentes antimicrobianos diminuída (SANTANA et al., 2013; ALMEIDA et al., 2016a; SHANKAR RAUT; MOHAN KARUPPAYIL, 2016).

4.4.1. Biofilmes

Os biofilmes são comunidades microbianas complexas, irreversivelmente associadas, onde os microrganismos estão ligados em uma superfície natural ou artificial, envolvidos por uma matriz polimérica (DONLAN, 2002). A matriz pode variar nas propriedades químicas e físicas, mas é composta principalmente de polissacarídeos. Alguns desses polissacarídeos são neutros ou polianiónicos, como é o caso da matrix extracelular polimérica (EPS) produzida por bactérias Gram-negativas. A presença de ácidos urônicos (D-glucurônico, D-galacturônico e manurônico) ou piruvatos confere propriedade aniônica (DONLAN, 2002). Essa propriedade é importante porque permite a associação de íons de cálcio e magnésio, que podem formar ligação cruzada com as cadeias poliméricas, fornecendo maior força de ligação em um biofilme desenvolvido (DONLAN, 2002; FLEMMING et al., 2000).

A produção da EPS é produzida pelos próprios microrganismos que compõem o biofilme como uma forma de proteção às defesas do hospedeiro e aos agentes terapêuticos (CHEN; WEN, 2011; DONLAN, 2002; LÓPEZ; VLAMAKIS; KOLTER, 2010). A organização do biofilme propicia um modo de crescimento protegido, permitindo sobrevivência de seus microrganismos num ambiente hostil, possibilitando maior disponibilidade de nutrientes através da cooperatividade metabólica e proteção aos fatores externos (LÓPEZ; VLAMAKIS; KOLTER, 2010).

Os biofilmes podem ser compostos por uma única espécie de microrganismo (biofilme monomicrobiano) ou por uma comunidade derivada de múltiplas espécies, biofilme polimicrobiano (PRATEEKSHA; BARIK; SINGH, 2019). Nos polimicrobianos o crescimento de uma espécie pode ser favorecido pela presença de outra em uma interação chamada de comensalismo (LÓPEZ; VLAMAKIS; KOLTER, 2010).

A formação do biofilme, Figura 5, é um processo coordenado por eventos moleculares iniciando com a ligação da célula microbiana em uma superfície (KRAGH et al., 2016). Nesta etapa há o envolvimento das interações químicas como as forças de *Van der Waals*, interações hidrofóbicas, eletrostáticas e ligações de hidrogênio entre as macromoléculas (CHEN; WEN, 2011). Após este estágio os microrganismos levemente aderidos, produzem exopolissacarídeos com os materiais da superfície

através da interação com receptores específicos presentes na superfície das paredes celulares finalizando assim o processo de adesão.



Figura 5: Etapas da formação do biofilme (PIRRONE; PINCIROLI; BERRA, 2016).

O processo de maturação do biofilme é caracterizado pelo crescimento e proliferação celular (CHEN; WEN, 2011) sendo controlado pela detecção de *quorum sensing* (QS), mecanismo que permite a comunicação microbiana, célula a célula, pela densidade celular e /ou regulação genética da base populacional (CHEN; WEN, 2011; PALUCH et al., 2020). Usando um sistema QS, células individuais podem produzir e liberar pequenas moléculas de sinalização e detectar o sinal no meio ambiente ao mesmo tempo. Vários sistemas de QS foram identificados e caracterizados, incluindo o sistema de lactonas N-acil-homoserina (AHL) e 4-quinolona de microrganismos Gram-negativos, sistemas peptídicos AgrD de bactérias Gram-positivas e sistemas AI2 / LuxS. Os sistemas de detecção de *quorum sensing* tem um papel crítico no estágio de maturação na formação do biofilme, na regulação da diferenciação celular e no desenvolvimento da estrutura do biofilme (CHEN; WEN, 2011).

Quando o biofilme atinge uma massa crítica, o equilíbrio dinâmico para o crescimento das células é compensado pela liberação de células planctônicas

disponíveis induzindo assim a colonização de outras superfícies e conseqüentemente formando novos biofilmes (PIRRONE; PINCIROLI; BERRA, 2016).

As células microbianas presentes no biofilme podem se aderir tanto em superfície sólidas como plástico e vidro, como em superfícies vivas (PRATEEKSHA & SINGH, 2019). Estudos já tem demonstrado a possibilidade de formação do biofilme em dispositivos médicos (implantes, cateteres intravenosos e urinários, próteses ortopédicas, próteses dentárias, entre outros) utilizados na assistência médica e resultando em taxas mensuráveis de infecções associadas a estes dispositivos (CHEN; WEN, 2011). O desenvolvimento do biofilme depende do tipo e do número de células que aderem ao dispositivo, na sua capacidade de adesão na superfície deste e do meio fluido no qual os microrganismos estão expostos (CHEN; WEN, 2011; DONLAN, 2002).

A presença de biofilme em superfícies humanas nem sempre são prejudiciais. Por exemplo, os biofilmes de placas dentárias compreendem dezenas de espécies de microrganismos e sua composição no biofilme poderão determinar a presença ou ausência da doença. Na placa dentária, com o aumento da colonização e a presença de espécies benéficas podem antagonizar a presença dos microrganismos prejudiciais (LÓPEZ; VLAMAKIS; KOLTER, 2010). No entanto, se a placa permanecer intacta nos dentes por vários dias poderá haver a alteração da flora microbiana (APARNA; YADAV, 2008).

Os biofilmes dentários, mais comumente chamados de placa bacteriana, seguem uma sequência de eventos que envolvem várias espécies de bactérias. Os colonizadores primários, estreptococos e actinomicetos, colonizam a superfície dos dentes através de moléculas de adesão (APARNA; YADAV, 2008), estes fornecem receptores únicos para a colonização de outros microrganismos mais patogênicos como *Fusobacterium nucleatum* (HE et al., 2012), *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* e *Porphyromonas gingivalis*, Figura 6, (KUBONIWA; LAMONT, 2010). Esses colonizadores expressam inúmeras adesões que permitem a ligação de outros colonizadores secundários, em particular *F. nucleatum* e *P. gingivalis* (KUBONIWA; LAMONT, 2010). As interações fisiológicas estão baseadas entre as afinidades metabólicas dos colonizadores tardios e os microrganismos precursores que podem promover a progressão do biofilme na placa em direção a um estado patogênico (KUBONIWA; LAMONT, 2010; WRIGHT et al., 2013).

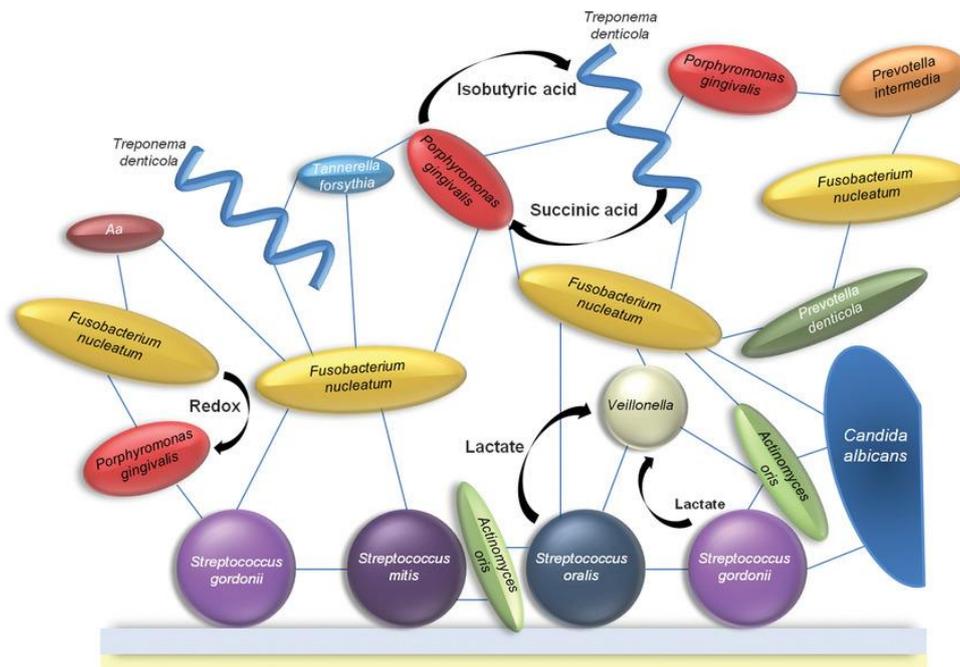


Figura 6: Interações bacterianas célula a célula no biofilme da placa dental, com exemplos de sinergia e mutualismo. Linhas que ligam os microrganismos representam interações adesivas. Onde Aa é *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (WRIGHT et al., 2013).

A comunicação intraespécies e interespecíes é feita através de sinalizadores que permitem o desenvolvimento dos microrganismos presentes no biofilme. As bactérias orais dependem de dois sistemas de sinalização distintos, o primeiro é restrito aos microrganismos Gram-positivos (estreptococos colonizadores primários) e usa peptídeos curtos denominados peptídeos de sinalização de competência, PSC (SUNTHARALINGAM; CVITKOVITCH, 2005) e/ou outros peptídeos pequenos (SON et al., 2012; WRIGHT et al., 2013). Estes mecanismos de sinalização foram descritos em *S. mutans* e *S. gordonii*, os quais desempenham um papel na troca e virulência genética (SON et al., 2012; SUNTHARALINGAM; CVITKOVITCH, 2005). O segundo sistema de sinalização envolve o autoindutor 2 (AI - 2), uma família de moléculas de sinalização produzidas pela ação da enzima LuxS, enzima envolvida no metabolismo da S-adenosil metionina responsáveis pela degradação da homocisteína (S-ribosil-homocisteína), gerando 4,5-dihidroxi-2,3-pentanodiona que se decompõe, produzindo AI-2 (SHAO; LAMONT; DEMUTH, 2007). A AI-2 foi originalmente descrita no organismo marinho *Vibrio harveyi*, como um sinal adicional ao controle na expressão de luminescência (BASSLER et al., 1993), atualmente é reconhecida como

um sinal independente da espécie sendo disseminado em bactérias orais, incluindo *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *S. gordonii* e *S. Mutans* (SHAO; LAMONT; DEMUTH, 2007; WRIGHT et al., 2013). Na ausência de AI-2, o *Streptococcus gordonii* também exibe desenvolvimento de biofilme e os efeitos do inter-domínio de AI-2 foram observados na interação entre *C. albicans* e *S. gordonii*, onde um nocaute de LuxS em *S. gordonii* é substancialmente afetado na formação do biofilme nas duas espécies (BAMFORD et al., 2009; WRIGHT et al., 2013). Tem sido sugerido que a mutação luxS afete a capacidade de *S. gordonii* promover o crescimento de hifas em *C. albicans*. A inibição da filamentação pode ser através do bloqueio ou desativação dos receptores de farnesol que induzem a sinalização em *C. albicans*, Figura 7: Diagrama de sinalização celular entre *Candida albicans* e estreptococos orais (WRIGHT et al., 2013). (BAMFORD et al., 2009).

Uma série de outras moléculas produzidas por bactérias que interferem na sinalização da formação de biofilme ou morfogênese de *C. albicans* foram identificadas, tais como, ácido láctico, H₂O₂, CO₂ e peptidoglicano, os quais atuam promovendo sua filamentação (BAMFORD et al., 2009; LU et al., 2019; XU et al., 2008). Sendo assim, os ácidos graxos, ácidos carboxílicos e glicanos produzidos por *C. albicans* são capazes de promover o crescimento de bactérias, enquanto inibem a formação de biofilme bacteriano (Pammi et al., 2011). Portanto, a filamentação de *C. albicans* e a formação de biofilme em espécies mistas são reguladas pelo reconhecimento de uma matriz complexa de moléculas sinalizadoras (PAMMI et al., 2011; WRIGHT et al., 2013).

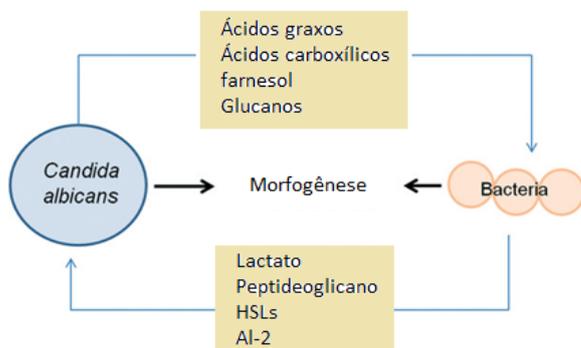


Figura 7: Diagrama de sinalização celular entre *Candida albicans* e estreptococos orais (WRIGHT et al., 2013).

Desta forma, fica evidente que a produção de biofilmes é um fator chave na resistência aos antifúngicos, principalmente nas *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. dubliniensis* (COWEN et al., 2014; ROBBINS et al., 2016). Com o aumento dos casos de resistência antifúngica, surge a necessidade de testes de suscetibilidade reprodutíveis, bem como a expansão e validação de novos agentes terapêuticos, e o reconhecimento da sua resistência (PFALLER, 2012).

4.5. Perfil de suscetibilidade

O European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) e o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), padronizam métodos para testes de suscetibilidade aos antifúngicos *in vitro*, os quais apresentam-se como um requisito importante na previsão e sucesso da resposta terapêutica (GOULART et al., 2018). Os resultados dos testes de suscetibilidade são afetados por uma variedade de fatores, tais como a concentração do inóculo, composição do meio de cultura, temperatura, tempo de incubação e as propriedades físico-químicas do agente antifúngico (LASS-FLÖRL et al., 2010).

O método de referência padronizado pelo Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) nos EUA – protocolo M27-A3 baseia-se na microdiluição e permite determinar as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) das espécies de leveduras como a *Candida* spp. e o *Cryptococcus* spp., demonstrando uma boa reprodutibilidade (CLSI, 2008).

Embora, os protocolos CLSI e EUCAST sejam equivalentes, verificam-se algumas diferenças importantes, como o tempo de incubação e a concentração do inóculo e, conseqüentemente os pontos de corte para cada antifúngico (ALASTRUEY-IZQUIERDO et al., 2015). Como alternativa aos testes de microdiluição em caldo, existem alguns testes que avaliam a susceptibilidade aos antifúngicos, tais como o método de difusão em agar e os métodos comerciais: Etest® (AB BIODISK, Solna, Suécia), Sensitre® (TREK Diagnostic Systems) e Vitek2® (Biomerieux) (LASS-FLÖRL; et al.; 2010; ALASTRUEY-IZQUIERDO et al., 2015).

O método de difusão em ágar utilizando os discos impregnados com antifúngicos, foi desenvolvido e validado para derivados azólicos e equinocandinas frente a *Candida* spp.. Este método apresenta algumas limitações quanto à subjetividade envolvida na leitura dos halos de inibição (CLSI M44 A2, 2009). Em

estudo realizado por Sav e colaboradores (2015) verificaram uma correlação de 90% em relação ao método de referência quando testadas cepas de *Candida* spp. frente ao fluconazol e voriconazol (SAV et al., 2015). Por sua vez, o método de difusão segundo um gradiente de concentração do fármaco, Etest®, é um método prático e fácil, apresenta uma correlação em torno de 70% em relação ao método de referência, CLSI (SEWELL; PFALLER; BARRY, 1994; KOGA-ITO; LYON; DE RESENDE, 2008).

O método espectrofotométrico, Vitek2® e o método colorimétrico, Sensitre®, apesar da sua fácil execução e reprodutibilidade, avaliam um número limitado de fármacos (LASS-FLÖRLE et al., 2010; ALASTRUEY-IZQUIERDO et al., 2015). Outro estudo realizado por Borghi e colaboradores (2010) comparou os resultados obtidos pelo método de microdiluição em caldo 24/48h com os obtidos pelo Vitek 2 e obteve uma correlação de 90,5% para *C. glabrata* e valores muito próximos para *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (BORGHI et al., 2010).

Através do estudo da suscetibilidade fúngica, percebe-se que os fungos estão sendo capazes de se adaptarem de forma rápida em resposta a pressão ambiental imposta pelos antifúngicos. Portanto, a busca por novas alternativas terapêuticas se faz necessário. As plantas medicinais tem apresentado uma alternativa quanto a atividade antimicrobiana (EDRIS, 2007; DAGLI et al., 2015; PARENTE-ROCHA et al., 2017). Vários pesquisadores têm relatado promissora atividade antifúngica através do uso de óleos essenciais extraídos de plantas medicinais (BESRA; KUMAR, 2018; GUCWA et al., 2018b; SOUZA et al., 2016; VIEIRA et al., 2014).

4.6. Óleos essenciais

Os óleos essenciais (OEs), também designados como óleo volátil, são uma mistura complexa de substâncias voláteis, dentre elas monoterpenos e sesquiterpenos e fenilpropanóides (BAKKALI et al., 2008). São líquidos, voláteis, límpidos e raramente coloridos, lipossolúveis e solúveis em solventes orgânicos com uma densidade geralmente menor do que a da água. Eles podem ser sintetizados por todos os órgãos da planta, ou seja, brotos, flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutas, raízes, madeira ou casca de árvore e são armazenados em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares (BURT, 2004).

O conteúdo total de óleo essencial no material vegetal varia de acordo com as espécies vegetais, características edafo-climáticas e época do ano. Podem ser extraídos por hidrodestilação, destilação por arraste de vapor, prensagem a frio e extração com solvente orgânico, classificados como métodos convencionais (ASBAHANI et al., 2015; YOUNIS et al., 2007) ou por métodos avançados ou inovadores, como extração por fluidos super críticos e destilação acelerada por micro-ondas (ASBAHANI et al., 2015).

A hidrodestilação é o método preconizado pela farmacopeia brasileira (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Neste método, o material vegetal aquecido arrasta o óleo essencial juntamente com o vapor de água. O hidrolato e a água sofrem condensação voltando à fase líquida, onde são separados por sua diferença de densidade em um decantador com graduação volumétrica (ASBAHANI et al., 2015). Na hidrodestilação os constituintes das espécies vegetais originais estão sujeitos a modificações químicas (hidrólise, desprotonações, hidratação e ciclizações) devido as altas temperaturas (GUAN et al., 2007; ASBAHANI et al., 2015). Os OEs obtidos diferem significativamente da essência original, especialmente se a ebulição for longa (ASBAHANI et al., 2015; GUAN et al., 2007). Na extração dos óleos essenciais de manjeriço, limão e capim-limão, a introdução de oxigênio no balão durante a extração levam a uma maior quantidade de compostos oxigenados no óleo, principalmente linalol, cânfora, α -terpineol, neral, geranial, eugenol e α -murolool, originando um óleo de maior atividade antioxidante. (FERREIRA et al., 2017).

O perfil dos constituintes químicos vai depender não somente do método de extração, mas também das condições durante o processamento e armazenamento do material vegetal, na destilação e no manuseio subsequente do próprio óleo (TUREK; STINTZING, 2013). O armazenamento ideal preconiza que sejam guardados no escuro em recipientes hermeticamente fechados (BURT, 2004). Os constituintes dos óleos essenciais podem sofrer reações de oxidação, isomerização, ciclização ou desidrogenação, acionadas enzimaticamente ou quimicamente, Figura 8. Os terpenóides, por exemplo, podem ser facilmente oxidados ou hidrolisados, dependendo de sua respectiva estrutura (TUREK; STINTZING, 2013). A luz ultravioleta e a luz visível aceleram os processos de oxidação que resultam na formação de radicais alquila. Estudo realizado por Turek e Stintzing evidenciou mudanças em vários óleos essenciais durante a estocagem sob o impacto da luz;

principalmente por um aumento considerável do p-cimeno, cânfora e óxido de cariofileno concomitante à degradação do β -cariofileno e dos monoterpenos β -mirceno, α -terpineno e α -fandandreno. Os óleos de diferentes espécies vegetais responderam de maneira diferente, sendo o óleo de alecrim o mais suscetível à luz do dia. (TUREK; STINTZING, 2011) e o óleo de erva-doce se apresentou extremamente instável, se degradando completamente em 2 meses mesmo no escuro (MISHARINA; POLSHKOV, 2005).

A oxidação e a decomposição de hidroperóxidos são facilitadas pelo aumento da temperatura (HĀDĀRUGĀ et al., 2014). Em contrapartida, temperaturas mais baixas favorecem a solubilidade do oxigênio nos líquidos, que por sua vez podem afetar negativamente a estabilidade dos óleos essenciais (BERNHARD; MARR, 1960). O óleo de alecrim demonstrou estabilidade pronunciada em temperaturas mais baixas (2 a 8°C), evitando as reações de oxidação por um período de 3 meses. No óleo de lavanda a formação de peróxidos foi promovida quando armazenada a 5°C (TUREK; STINTZING, 2011)



Figura 8: Principais reações de degradação dos constituintes dos óleos essenciais. Adaptado(TUREK; STINTZING, 2013)

Os OEs contêm vários constituintes que podem ter influência em atividades biológicas, isoladamente ou associados a outros componentes. Apresentam uma ampla gama de propriedades farmacológicas, tais como ação antioxidante, analgésica, sedativa, anti-inflamatória, antiviral e antimicrobiana (ADORJAN; BUCHBAUER, 2010; BAKKALI et al., 2008). Os OEs são uma ótima fonte de estudo na busca por novos agentes antifúngicos, uma vez que não agem em alvos específicos da célula fúngica impedindo a adaptação aos mesmos (CARSON; MEE;

RILEY, 2002). Estudos recentes têm demonstrado o uso potencial de óleos essenciais de *Origanum vulgare* L. (BROCHOT et al., 2017; STOJKOVIĆ et al., 2013); *Cinnamomum cassia* L. e *Pelargonium graveolens* L'Her (DOS SANTOS et al., 2020; GUCWA et al., 2018b) com atividade antifúngica em isolados resistentes de *Candida* spp..

3.6.1. *Pelargonium graveolens* L'Her

O gênero *Pelargonium*, pertencente a família Geraniaceae, vem sendo pesquisado sobre seu potencial farmacológico. Estudos tem demonstrado atividade antibacteriana, antioxidante (OUEDRHIRI et al., 2017), ansiolítica, antidepressiva (ABOUHOSSEINI TABARI et al., 2018), anti-parasitário (IRIODA et al., 2017), anti-inflamatória e antifúngica (ESSID et al., 2017a; GIONGO et al., 2016, 2017) em espécies deste gênero. As espécies mais estudadas são *P. roseum* (Andrews) DC; *P. sidoides* DC, *P. asperum* Ehrh. ex Willd, *P. endlicherianum* Fenzl e *P. graveolens* L'Her (GIONGO et al., 2016; ESSID et al., 2017, GIONGO et al., 2017; IRIODA et al., 2017; OUEDRHIRI et al., 2017).

O *Pelargonium graveolens* L'Hér, Figura 9, popularmente conhecido como o gerânio é um arbusto ramificado de folhas aveludadas, devido à presença dos pelos glandulares. Os caules são herbáceos quando jovens, tornando-se lenhosos com a idade (ALI et al., 2015; BOUKHRIS et al., 2012; CARMEN; HANCU, 2014). Seu óleo essencial é composto principalmente por geraniol, linalol, citronelol, mentona,

Figura 10, formiato de citronelila, para-cariofileno, gama-muuroleno, óxido de cariofileno, delta-cadineno, delta-humuleno, geranil Isobutirato, delta-gurjuneno, germacreno D, óxido cis-rosa e acetato de citronelila (DABIRI et al., 2011; SARASWATHI et al., 2011; BOUKHRIS et al., 2013; CARMEN; HANCU, 2014; SOUZA et al., 2016). A composição do óleo essencial pode ser alterada quali e quantitativamente dependendo das condições edafoclimáticas. Espécies de *Pelargonium* apresentam maior concentrações de linalol, geraniol e seus ésteres nos meses de inverno e concentrações máximas de citronelol e seus ésteres nos meses de verão (RAO; RAMESHS, 1996; BOUKHRIS et al., 2013).



Figura 9: *Pelargonium graveolens* L'Her (ALI et al., 2015).

O óleo de *Pelargonium* é um óleo volátil e pode ser obtido através da hidrodestilação das partes aéreas de várias espécies de *Pelargonium*, tendo como constituinte principal o geraniol (SWEETMAN, 2011) e apresenta um rendimento de 1,0 a 1,3 % (BLANK et al., 2012). Um estudo clínico envolvendo 30 pacientes indicou a aplicação tópica do óleo de gerânio no manejo da dor neuralgica ocasionada por herpes (SWEETMAN, 2011).

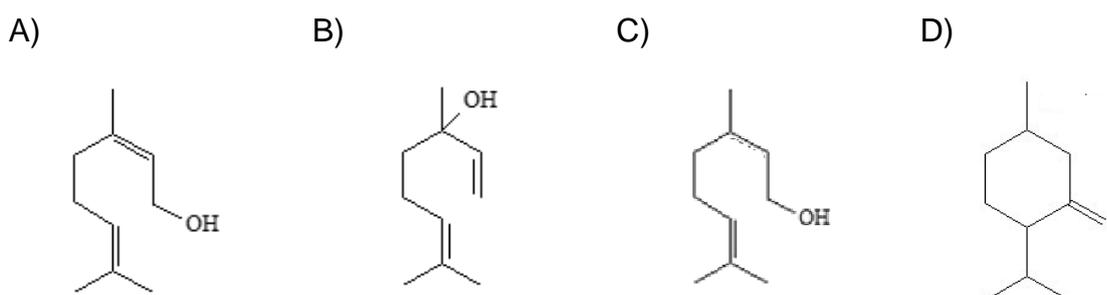


Figura 10: Principais constituintes de *Pelargonium graveolens* L'Her . A) geraniol B) linalol C) citronelol D) mentona (SOUZA et al., 2016).

Estudos recentes têm demonstrado atividade antifúngica do óleo essencial de *Pelargonium graveolens* L'Her (DOS SANTOS et al., 2020; ESSID et al., 2017a; GIONGO et al., 2016), do geraniol (BARD et al., 1988; LEITE et al., 2015), citronelol (MAHBOUBI; MAHDIZADEH; HEIDARYTABAR, 2018) e linalol (DIAS et al., 2018).

A atividade antifúngica do óleo essencial de gerânio foi avaliada frente a cepas de *C. albicans* apresentando um CIM de 250 µg/mL (DŽAMIĆ et al., 2014) e frente a *Candida* spp. foram obtidos resultados de CIM entre 500 e 250 µg/mL para 10 dos 11 isolados estudados de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. riferii* e um CIM de 1000 µg/mL para uma cepa de *C. albicans* (ESSID et al., 2017). Em trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa, a análise de óleos essenciais de *Pelargonium graveolens* L'Her provenientes de diferentes regiões obteve os melhores resultados com os óleos da África do Sul e Egito com CIM de 256 e 128 µg/mL frente a *Candida* spp. Os óleos essenciais de maior atividade antifúngica possuem em sua constituição química 70% de monoterpenos oxigenados, sendo o citrionelol o constituinte majoritário (DOS SANTOS et al., 2020). Em outro estudo com óleo da mesma região (Egito), os valores de CIM variaram de 500 a 125 µg/mL frente a *Candida* spp. (FERRÃO et al., 2020).

O mecanismo de ação dos monoterpenos como geraniol e citrionelol não foi completamente elucidado, mas tem sido relatado que eles induzem a ruptura da membrana celular aumentando sua fluidez e permeabilidade (DE OLIVEIRA PEREIRA et al., 2015; LIRA et al., 2020). Leite e colaboradores (2015) observaram que o geraniol foi capaz de inibir a formação de pseudo-hifas e clamidoconídios das *Candida* spp.. Singh e colaboradores (2018) verificaram que o geraniol é capaz de diminuir a adesão celular, diminuindo a formação de biofilme (SINGH et al., 2019).

O óleo essencial de *Pelargonium graveolens* l'Her também apresentou atividade antibiofilme, tanto nos estágios iniciais como em biofilme pré-formado e foi verificado também sua capacidade de penetração no biofilme pré-formado em *Staphylococcus epidermidis* (KANNAPPAN et al., 2017).

4.6.2. *Cinnamomum cassia* L.

O gênero *Cinnamomum* (Lauraceae) é constituído de várias espécies importantes na produção de óleos essenciais. O valor comercial dos óleos de *Cinnamomum* depende da espécie e da parte da planta utilizada. Os óleos essenciais mais relevantes no mercado mundial são os obtidos de *Cinnamomum zeylanicum* Blume, *Cinnamomum cassia* L. e *Cinnamomum camphora* (L.) J. Presl (KUMAR; KUMARI, 2019).

O *Cinnamomum cassia* L., popularmente conhecido como canela-da-china, é um tipo de árvore perene decídua nativa do sudeste da Ásia, Figura 11 e de ampla ocorrência (ZHANG et al., 2019). Possui alto valor econômico e é utilizada na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica (JADHAV et al., 2020; ZHANG et al., 2019). Apresenta propriedades anti-inflamatória, antioxidante, atividade anti-ulcerogênica, antipirética, antimicrobiana, antidiabética, antitumoral e antileishmania (YANG; LI; CHUANG, 2012; AL-SHAMIDAY; AL-MAMOORI, 2018; OZBAK et al., 2019). O óleo essencial de *Cinammomum cassia* L. pode ser extraído de folhas ou ramos jovens e é constituído predominantemente por trans-cinamaldeído (Figura 12), possui um rendimento mínimo de 1% (FARMACOPEIA, 2010). Seu óleo possui atividade antimicrobiana inibindo o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Salmonella typhymurium*), fungos filamentosos e *Candida* spp. (OOI et al., 2006).



Figura 11: Casca de *Cinammomum cassia* L. (AL-SHAMIDAY; AL-MAMOORI, 2018).

A atividade antifúngica do óleo essencial de *C. cassia* frente as espécies de *Candida* tem sido estudada, obtendo-se valores de CIM de 500 µg/mL com a *C. albicans* ATCC 90029 (GIORDANI et al., 2006), CIM de 138, 225, 450 e 110 µg/mL frente a *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei* respectivamente (OOI et al., 2006), CIM de 62,5 µg/mL frente a *C. glabrata* resistente ao fluconazol (ALMEIDA et al., 2017) e valores de CIM de 500 a 31,25 µg/ml para espécies de *Candida*, sensíveis e resistentes ao fluconazol (FERRÃO et al., 2020).

O mecanismo de ação do cinamaldeído e seus isômeros vem sendo estudado ao longo dos anos e foi verificado que o cinamaldeído atua como um inibidor da ATPase, levando a acidificação intracelular ou inibindo a biossíntese da parede celular (SHREAZ et al., 2011), indutor da hidrólise de quitinas, afetando a integridade celular (OUYANG et al., 2019), atua no efluxo de cálcio (HU et al., 2013) e previne a formação de biofilme (KOT et al., 2015). E Xing e colaboradores (2014) demonstraram que o cinamaldeído causa alterações morfológicas e ultraestruturais deletérias, como a falta de conteúdo citoplasmático e destruição de mitocôndrias em *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides* (XING et al., 2014).

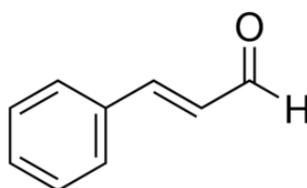


Figura 12: Estrutura química do trans-cinamaldeído (KOT et al., 2015).

4.6.3. *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry.

O *Syzygium aromaticum* (L.) Merr.& Perry da Família Myrtaceae, popularmente conhecido como cravo-da-india, é uma árvore perene de 10 a 20 m de altura, nativa da Índia, Indonésia, Zanzibar, Maurício e Sri Lanka (RYU et al., 2016). O óleo volátil obtido por hidrodestilação, a partir de botões florais secos, Figura 13, é constituído majoritariamente por eugenol, em torno de 85% (FARMACOPEIA, 2010). Possui uma ampla gama de atividades farmacológicas como anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana (RADÜNZ et al., 2019), antiviral (CHOI et al., 2014), anticarcinogênica (RYU et al., 2016) e propriedade antifúngica frente a *Candida* spp., *Aspergillus* spp. e espécies de dermatófitos (PINTO et al., 2009).



Figura 13: *Syzigium aromaticum* (L.) Merr. & Perr (RYU et al., 2016).

O eugenol, Figura 14, seu principal constituinte, vem sendo amplamente estudado e apresenta atividade antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, analgésica, anestésica, antipirética, antiplaquetária e antiviral (MARCHESI et al., 2017). Estudo realizado por Braga e colaboradores (2007) verificou que o eugenol induziu alterações morfológicas no envelope de *C. albicans*, reduziu significativamente o número de leveduras normais e aumentou o número de células danificadas com superfícies ásperas e enrugadas. Os autores sugeriram que o eugenol, devido à sua natureza lipofílica, poderia interagir com a bicamada lipídica da membrana, alterando fluidez e permeabilidade. A alteração na morfologia do envelope de *C. albicans* pode comprometer a adesão às células hospedeiras e formação de hifas, reduzindo a capacidade do fungo em colonizar e infectar tecidos do hospedeiro, tornando-o uma alternativa para o tratamento da candidíase (BRAGA et al., 2007).

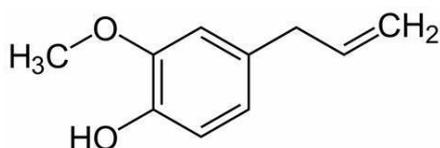


Figura 14: Estrutura química do eugenol (FREIRES et al., 2015).

4.6.4. *Myristica fragrans* Houtt

Myristica fragrans Houtt, Família Myristicaceae, conhecido popularmente como noz-moscada, é principalmente cultivado para especiarias na Indonésia. Na noz-moscada, Figura 15, o caroço da semente no interior do fruto é utilizado (SHAFIEI

et al., 2012). Os principais compostos do óleo essencial da noz-moscada são miristicina, safrol, sabineno, elimicina, limoneno, mirceno, terpinoleno, pineno, canfeno (Figura 16) erpineol e eugenol (MARGARET; NEERAJA, 2016).

Os extratos brutos de acetato de etila e etanol do fruto inteiro de *Myristica fragrans* Houtt exibiram promissor potencial antibacteriano contra patógenos orais, tais como, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius* e *Porphyromonas gingivalis* (SHAFIEI et al., 2012). O extrato do fruto, em acetona, apresentou efeito citotóxico e apoptótico em células orais de carcinoma escamoso (RENGASAMY et al., 2018). O óleo essencial de noz-moscada apresenta propriedades antioxidantes e antimicrobiana (PERIASAMY et al., 2016).



Figura 15: *Myristica fragrans* Houtt (MARGARET; NEERAJA, 2016).

Poucos estudos são encontrados sobre a atividade antifúngica do óleo essencial de noz moscada. O óleo essencial de noz moscada proveniente das Ilhas de Andamão quando testado frente a *C. albicans* não demonstrou atividade antifúngica pelo método de Kirb Bauer (PAL. MAHESH. et al., 2011). No entanto em estudo recente do nosso grupo de pesquisa, o óleo essencial de noz moscada apresentou CIM de 1000 a 31,25 ug/mL frente a *Candida* spp. (FERRÃO et al., 2020).

O extrato aquoso da semente de noz-moscada demonstrou potencial atividade antimicrobiana e antibiofilme frente aos microrganismos anaeróbicos e *Salmonella typhi* através da inibição no *quorum sensing* (BALAKRISHNAN et al., 2020; MULLER; MULLER; COLLEGE, 2019).

Não há evidências de eventos adversos quando ingerido em pequenas dosagens, no entanto altas concentrações de noz-moscada, podem estar relacionadas a efeitos psicoativos devido a presença da miristicina, inibidor da

monoamino oxidase. Em humanos, doses de miristicina acima de 1-2 mg/kg de peso corporal podem causar náuseas, taquicardia e convulsões (BECKERMAN; PERSAUD, 2019; HALLSTROM; THUVANDER, 1997).

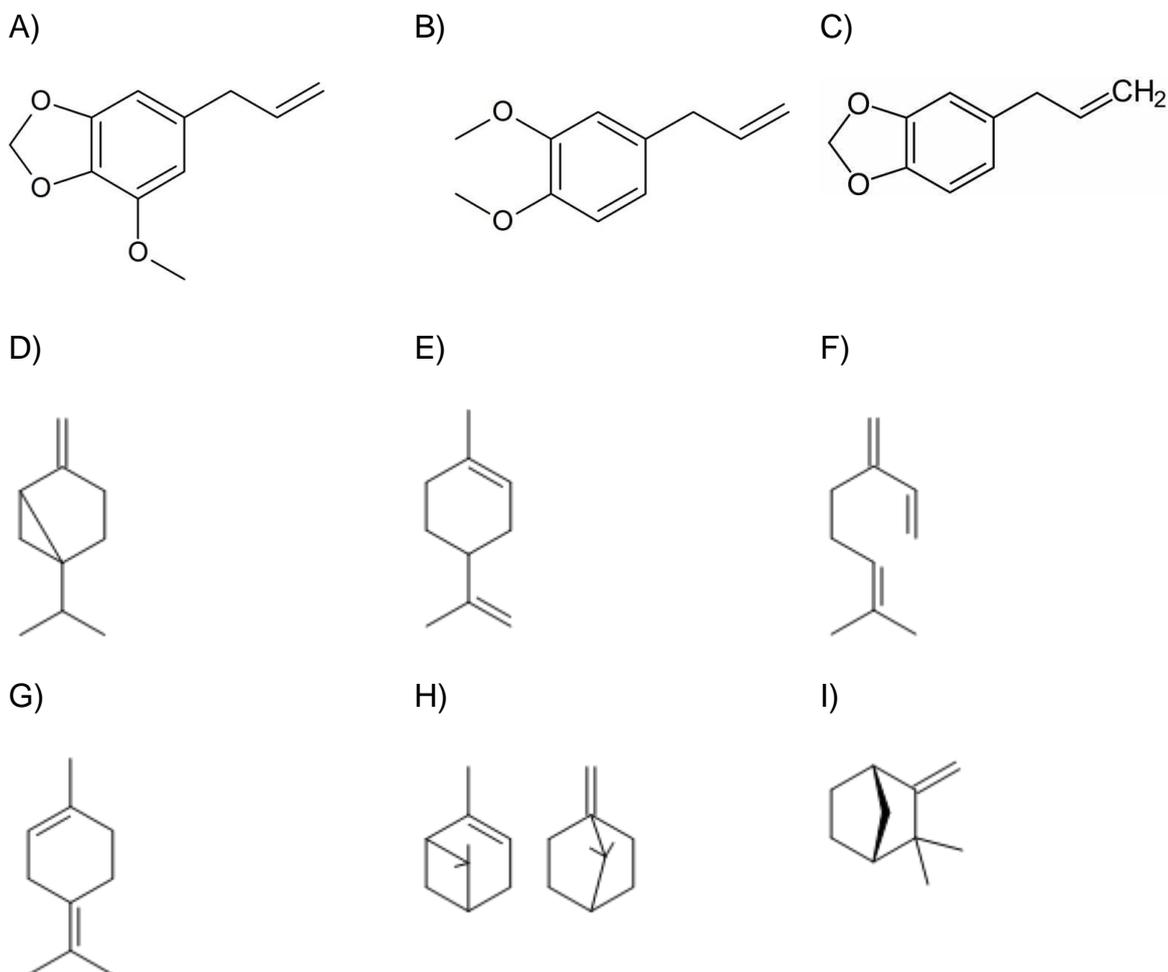


Figura 16: Estrutura química dos constituintes químicos presentes no óleo essencial de noz moscada. A) miristicina (DOLAN; MATULKA; BURDOCK, 2010) B) elimicina C) safrol (AL-MALAHMEH et al., 2017), D) sabineno E) limoneno F) mirceno G) terpinoleno H) alfa e beta- pineno I) canfeno (MA, 2012).

O uso de óleos essenciais e seus componentes às vezes pode ser limitado devido a necessidade de uma alta concentração antimicrobiana ou mesmo por exceder ao nível sensorial aceitável, dependendo do produto final. No entanto, estudos tem sido realizado demonstrando que um constituinte do óleo essencial pode exibir maior ou menor ação antimicrobiana quando testado separadamente. Há algumas evidências de interações farmacológicas impactando na ação antimicrobiana quando os componentes de óleos essenciais são usados em combinação com outros

agentes, tanto sintéticos quanto naturais (GAVARIC et al., 2015; STOJKOVIĆ et al., 2013).

4.7. Interações farmacológicas

O uso concomitante de duas substâncias é uma estratégia comumente usada para o tratamento de várias doenças, o que possibilita o aumento da eficácia com diminuição da toxicidade (GAVARIC et al., 2015). A combinação de medicamentos também é uma estratégia válida para transpor a resistência antifúngica em infecções por *C. albicans* (CUI et al., 2015; XU et al., 2019). Muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas sobre a combinação de substâncias, investigando não apenas a utilização de dois fármacos mas também sua combinação com outros agentes terapêuticos (GAVARIC et al., 2015; LI et al., 2017; XU et al., 2019). Produtos naturais representam uma grande fonte de recursos na pesquisa sobre a atividade sinérgica devido a sua diversidade estrutural (GAVARIC et al., 2015; LI et al., 2017; XU et al., 2019). Os constituintes como o ostole (cumarina isolada de *Cnidium monnieri* L. com reconhecida atividade neuroprotetora, imunomoduladora e antiinflamatória), apresentam atividade sinérgica significativa com fluconazol, miconazol e itraconazol embora tenham demonstrado pouca atividade antifúngica quando testados isoladamente (LI et al., 2017), o mesmo acontece com a glabridina (LIU et al., 2014). A glabridina (uma das principais isoflavanas ativas de *Glycyrrhiza glabra*) já apresentou forte efeito sinérgico com o fluconazol frente a *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. neoformans* embora apresente baixa atividade antifúngica (LIU et al., 2014). Alguns agentes não-antifúngicos, como a geldanamicina, nimesulida, sinvastatina e a amiodarona tem sido considerados úteis na melhoria da atividade de fármacos antifúngicos (CUI et al., 2015; DA SILVA et al., 2013; LIU et al., 2014). A amiodarona, reguladora da homeostase do cálcio, quando administrada concomitantemente com o fluconazol, exibiu atividade antifúngica frente a *C. tropicalis* resistente ao fluconazol, através de alterações na integridade da membrana celular levando à morte celular por apoptose (DA SILVA et al., 2013). A sinvastatina tem apresentado atividade sinérgica em cepas de *C. albicans* com elevados CIM para o fluconazol, atuando através da inibição da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaryl reductase, reduzindo a síntese do ergosterol nas leveduras (MENEZES et al., 2012).

Estudos recentes têm reportado a atividade sinérgica *in vitro* em combinações de óleos essenciais com antimicrobianos. O óleo essencial de *Mentha piperita* L.

(Lamiaceae) demonstrou efeito sinérgico muito forte na combinação com gentamicina, possibilitando uma diminuição do fármaco em 33 vezes para *Bacillus cereus* ATCC 10876 e de 50 vezes para *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Efeito sinérgico também foi observado contra as cepas das leveduras *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. kefyr*, embora menos evidente, reduzindo de 2 a 3 vezes a concentração mínima de fluconazol, miconazol e anfotericina B (ROSATO et al., 2018). A adição do óleo essencial *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae) e seus principais componentes (geraniol e linalool) com fluconazol demonstrou efeito sinérgico entre geraniol e fluconazol e entre geraniol e linalol contra o *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans* (CARDOSO et al., 2016). Em um estudo de Xu e colaboradores (2019) foi verificado que a utilização do eucaliptal D e o fluconazol foi capaz de restaurar significativamente a atividade antifúngica do azol frente a *C. albicans* resistente, através da inibição competitiva na bomba de efluxo diminuindo a excreção do azol (XU et al., 2019).

Uma outra alternativa que vem sendo estudada para a potencialização da atividade antifúngica é a utilização de filmes poliméricos bioadesivos em formulações, tais como a quitosana (LARA et al., 2018).

4.7.1. Quitosana

A quitosana, Figura 17, é um biopolímero com massa molar média geralmente maior do que 10^5 Daltons. O grau de desacetilação, distribuição de massa molar e conteúdo de impurezas dependem das fontes naturais de matéria-prima e dos métodos de preparação. A quitosana é obtida pela reação de desacetilação da quitina em meio alcalino (AZEVEDO et al., 2007). A quitina é um polímero natural extraído de exoesqueleto de crustáceos e insetos, composto por unidades monoméricas de N-acetil-D-glucosamina unidas por ligação β -(1;4). Seu grau de desacetilação varia de 60 a 90% e peso molecular de 50 a 2000 KDa, dependendo da sua origem biológica e do método de processamento (MÁRMOL et al., 2011). A solubilidade da quitosana depende do grau de desacetilação, da distribuição média dos grupos acetil ao longo da cadeia principal e do seu peso molecular (AZEVEDO et al., 2007; TAVARIA et al., 2013) e isso afeta diretamente as aplicações a que podem estar sujeita (TAVARIA et al., 2013).

Na indústria de alimentos são utilizadas com diversas finalidades, remoção de partículas coloidais em águas residuais (YANG, 2016), como adsorvente e antioxidante na fabricação de vinhos (LARANJEIRA; DE FÁVERE, 2009; R. BARÓN, M. MAYÉN, 1998), como revestimento na superfície de frutas e vegetais para prolongamento da vida útil dos mesmos, na preservação de alimentos e impedindo a proliferação de microrganismos (AZEVEDO et al., 2007; LARANJEIRA; DE FÁVERE, 2009). Um estudo *in vitro* verificou que a adição de filmes formados pela associação de quitosana e o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. ou de *Cinnamomum* spp. na concentração de 1000 µg/mL inibiram completamente o crescimento do *Botrytis* spp. e *Penicillium* spp. nos frutos de *Punica granatum* L., romã (MUNHUWEYI et al., 2017). A associação de quitosana 5000 µg/mL e 0,3, 0,6 ou 1,25mL/mL de *Mentha piperita* L. foi eficiente para controlar completamente o crescimento micelial de cinco espécies diferentes de *Colletotrichum* spp. agentes causadores de antracnose em *Mangifera indica* L, manga (LIMA OLIVEIRA et al., 2018).

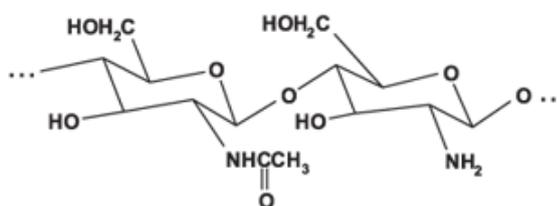


Figura 17: Estrutura química da quitosana (LARANJEIRA; DE FÁVERE, 2009).

A quitosana de alto e médio peso molecular apresenta adsorção aumentada nas paredes celulares, levando à cobertura das paredes celulares e o enfraquecimento da membrana, interrupção e vazamento celular. (GARCIA et al., 2018; LIMA OLIVEIRA et al., 2018). Por outro lado, a quitosana de baixo peso molecular pode penetrar nas células vivas, levando à inibição de várias enzimas e à interrupção da síntese de proteínas, fazendo interface com a síntese de mRNA (GARCIA et al., 2018). A quitosana também pode inibir o crescimento microbiano pela quelatão de nutrientes e metais essenciais como cobre e ferro. Os íons metálicos que se combinam com as moléculas da parede celular do microrganismo são fundamentais para a estabilidade da parede celular (YUAN et al., 2016).

Nos últimos anos houve um crescente interesse na utilização da quitosana e seus oligômeros como materiais bioativos devido a sua biocompatibilidade (GANAN et al., 2019; LARANJEIRA; DE FÁVERE, 2009; YADAV et al., 2017). No campo biomédico é utilizada tanto na regeneração de tecidos, como agente facilitador na administração de medicamentos e na indústria farmacêutica em nano formulações (DOS SANTOS et al., 2020; KEYKHOSRAVY et al., 2020; SHOKRI et al., 2020).

Na odontologia, vem sendo estudada como uma alternativa nas formulações destinadas a mucosa oral, devido a sua característica mucoadesiva. Kloster e colaboradores (2018) avaliaram o efeito antimicrobiano *in vitro* de uma membrana bioadesiva à base de quitosana com clorexidina para o tratamento local de infecções nos tecidos orais. Os autores verificaram que a associação de clorexidina e quitosana em membranas com concentrações acima de 2% de clorexidina foi eficaz frente a *C. albicans* e *S. mutans* (KLOSTER et al., 2018).

Garcia e colaboradores (2018) verificaram em seu estudo que a adição de quitosana ocasionou uma diminuição de 70% no crescimento fúngico e na capacidade de formação de biofilme por *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (GARCIA et al., 2018). Em outro estudo foi evidenciado que nanopartículas de quitosanas diminuem a formação do biofilme de *Candida* spp. na superfície de resina acrílica da base de próteses dentárias. O percentual de inibição das nanopartículas de quitosana em *C. albicans* foram proporcionais à sua concentração, independentemente do tempo de exposição, sendo capazes de inibir até 50% da adesão, 75% na formação de biofilme e 75% no biofilme maduro (GONDIM et al., 2018).

Ganan e colaboradores (2019) observaram efeitos sinérgicos entre quitosana e fluconazol mais pronunciados que entre quitosana e anfotericina B quando testados em *C. albicans* e *C. guilliermondii*. A associação de quitosana a outros agentes antifúngicos pode abrir novas perspectivas terapêuticas para o tratamento da candidíase, conforme já foi comprovado pelo nosso grupo de pesquisa, em formulações tópicas para o tratamento da candidíase vaginal (DOS SANTOS et al., 2020). Os efeitos sinérgicos podem ser usados para reduzir as doses necessárias de antifúngicos e/ou para melhorar a eficácia dos agentes terapêuticos disponíveis atualmente (GANAN et al., 2019).

5. MANUSCRITO I:

Prevalence and susceptibility profile of *Candida* spp. in dental prosthesis users

Entre as páginas 64 e 80 encontra-se o manuscrito I intitulado *Prevalence and susceptibility profile of Candida spp in dental prosthesis users* aborda a prevalência de *Candida spp* em pacientes do Hospital de Odontologia da UFRGS com e sem prótese dentárias e o perfil de suscetibilidade destes isolados clínicos frente aos antifúngicos fluconazol, cetoconazol, itraconazol e nistatina. O mesmo foi suprimido por estar submetido a revista *científica*.

6. MANUSCRITO II:

Adhesion and biofilm formation capacity of *Candida* spp. clinical isolates from dental prosthesis users

Entre as páginas 82 e 94 encontra-se o manuscrito II, *Adhesion and biofilm formation capacity of Candida spp. clinical isolates from dental prosthesis users*, avalia a capacidade de adesão e formação de biofilme de isolados clínicos de *Candida spp* provenientes de pacientes do Hospital de Odontologia da UFRGS com e sem prótese dentária. O mesmo foi suprimido pois será submetido a revista científica.

7. MANUCRITO III:

Atividade antifúngica de óleos essenciais frente a *Candida* spp.

O manuscrito III intitulado Atividade antifúngica de óleos essenciais frente a *Candida* spp. aborda a atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Pelargonium graveolens* L'Her (gerânio; Geranaceae), *Cinnamomum cassia* L. (canela; Lauraceae), *Syzygium aromaticum* L. Merr. & L.M. Perry (cravo; Myrtaceae) and *Myristica fragrans* Houtt (noz moscada; Myristicaceae) frente a isolados clínicos de *Candida* spp provenientes da mucosa oral de pacientes do Hospital de Odontologia da UFRGS e foi publicado na revista *Brazilian Journal of Health Review*. Vol. 3, n. 1 p. 100-113

Atividade antifúngica de óleos essenciais frente a *Candida* spp.**Antifungal activity of essential oils against *Candida* spp.**

DOI:10.34119/bjhrv3n1-007

Aceitação para publicação: 07/01/2020

Simone Krause Ferrão

M.a Farmacêutica- discente no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS

Instituição: Faculdade de Farmácia da UFRGS

Endereço: Av. Ipiranga, 2752 - Azenha, Porto Alegre - RS, 90610-000

Juliana Butzge

Biomédica- discente no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS

Instituição: Faculdade de Farmácia da UFRGS

Endereço: Av. Ipiranga, 2752 - Azenha, Porto Alegre - RS, 90610-000

Leticia Mezzomo

Discente no Curso de Farmácia na Faculdade de Farmácia da UFRGS Instituição:

Faculdade de Farmácia da UFRGS

Endereço: Av. Ipiranga, 2752 - Azenha, Porto Alegre - RS, 90610-000

Luciane Noal Calil

D.ra Farmacêutica- docente no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS

Instituição: Faculdade de Farmácia da UFRGS

Endereço: Av. Ipiranga, 2752 - Azenha, Porto Alegre - RS, 90610-000

Miriam Apel

D.ra Farmacêutica- docente no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS

Instituição: Faculdade de Farmácia da UFRGS

Endereço: Av. Ipiranga, 2752 - Azenha, Porto Alegre - RS, 90610-000

Adelina Mezzari

D.ra Farmacêutica- docente no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS

Instituição: Faculdade de Farmácia da UFRGS

Endereço: Av. Ipiranga, 2752 - Azenha, Porto Alegre - RS, 90610-000

Renata Pereira Limberger

D.ra Farmacêutica- docente no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS

Instituição: Faculdade de Farmácia da UFRGS

Endereço: Av. Ipiranga, 2752 - Azenha, Porto Alegre - RS, 90610-000

RESUMO

A candidíase é uma micose oportunista causada por leveduras do gênero *Candida*, que fazem parte da microbiota humana. Vários fatores podem predispor ao desenvolvimento de candidíase oral, como xerostomia, imunossupressão e uso de próteses dentárias. Os principais fatores epidemiológicos da candidíase dependem da predisposição do hospedeiro, carga parasitária e virulência fúngica. Em geral, o tratamento da candidíase oral utiliza a nistatina como primeira escolha. Quando este medicamento não é efetivo, pode-se empregar o fluconazol e o itraconazol. No entanto, nas últimas décadas, houve um grande aumento da resistência aos agentes antifúngicos utilizados na prática terapêutica. Isso justifica a necessidade de prospecção de novos agentes antifúngicos. Dessa forma, os óleos essenciais de plantas representam uma importante fonte renovável com potencial contra cepas resistentes. Este estudo tem como objetivo avaliar a atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Pelargonium graveolens* L'Her (gerânio; Geranaceae), *Cinnamomum cassia* L. (canela; Lauraceae), *Syzygium aromaticum* L. Merr. & L.M. Perry (cravo; Myrtaceae) and *Myristica fragrans* Houtt (noz moscada; Myristicaceae) sobre *Candida* spp., através do método de microdiluição em caldo de acordo com o protocolo M-27 A2 recomendado pelo Comitê Nacional de Padrões de Laboratório Clínico (Aprovação no comitê de ética n. 2.236.863, CEP-UFRGS).

Palavras-chave: *Candida*, essential oil, suscetibilidade, antifúngicos

ABSTRACT

Candidiasis is an opportunistic mycosis caused by yeasts of the *Candida* genus, which is part of the human microbiota. Several factors may predispose the development of oral candidiasis, such as xerostomia, immunosuppression, and the use of dental prostheses. The mainly epidemiology factors of candidiasis depends on the predisposition of the host, parasitic loading and fungal virulence. In general, the treatment of oral candidiasis uses nystatin as the first choice. When this medicine is not efective, the use of fluconazole and itraconazole can be employed. However, in recent decades, there has been a great increase in resistance to the antifungal agents used in therapeutic practice. This justifies the necessity of prospecting for new antifungal agents. In this way, essential oils from plants represent an important renewable source with potential against resistant strains. This study aims to evaluate the antifungal activity of essential oils obtained from *Pelargonium graveolens* L'Her (v.n. geranium; Geranaceae), *Cinnamomum cassia* L. (v.n. cinnamon; Lauraceae), *Syzygium aromaticum* L. Merr. & L.M. Perry (v.n. clove; Myrtaceae) and *Myristica fragrans* Houtt (v.n. nutmeg; Myristicaceae) against strains of *Candida* spp., by the broth microdilution assay according to the methodology M-27 A3 recommended by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (Ethical approval 2.236.863, CEP-UFRGS).

Key words: *Candida*, essential oil, suscetibility, antifungal.

1 INTRODUÇÃO

A candidíase é uma micose oportunista causada por espécies do gênero *Candida*. Essas leveduras fazem parte da flora normal da cavidade oral, trato gastrointestinal e urinário de indivíduos sadios (GARCIA-CUESTA; SARRION-PEREZ; BAGAN, 2014; HANI et al., 2015).

A microbiota oral é composta por uma grande variedade de microrganismos como as leveduras do gênero *Candida*, os quais sobrevivem em condições de simbiose, que na maioria das vezes são comensais, não causando prejuízos ao organismo do hospedeiro (GERMANO et al., 2018). *C. albicans* é a espécie mais prevalente seguida de *C. tropicalis*, *C. guilhermondii*, *C. glabrata* e *C. parapslosis* (MARCO-ARIAS et al., 2009), *C. stellatoidea*, *C. krusei*, *C. kefyr*, e *C. dubliniensis* (FARAH; LYNCH; MCCULLOUGH, 2010). Múltiplas apresentações clínicas de candidíase, podem ocorrer sendo estas ser causadas por uma espécie isoladamente ou em infecção mista (FARAH; LYNCH; MCCULLOUGH, 2010; REINHARDT et al., 2019). As manifestações clínicas podem ocorrer desde formas superficiais e mais leves como a candidíase esofágica ou orofaríngea até as infecções graves, como a candidemia (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

O isolamento de *Candida* spp. da cavidade oral não implica necessariamente em quadro de infecção (SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2001; LEITE; PIVA; MARTINS FILHO, 2015). Sua prevalência assintomática em pessoas saudáveis varia de 3 a 48% (SCULLY; EI-KABIR; SAMARANAYAKE, 1994; ABU-ELTEEN; HAMAD; SALAH, 2006), sendo mais alto em crianças 20 a 45% (KADIR; UYGUN; AKYÜZ, 2005; SILVA et al., 2015) e 50-75% em usuários de próteses dentárias (DARWAZEH; AL-REFAI; ALMOJAIWEL, 2001; MARCOS-ARIAS et al., 2009).

Para o tratamento da candidíase oral podem ser utilizados antifúngicos tópicos ou sistêmicos, em diferentes formas farmacêuticas. O Guideline for the Management of Candidiasis (2016) preconiza nistatina tópica como tratamento de primeira escolha para candidíase oral. Outros antifúngicos, como fluconazol e itraconazol podem ser indicados quando o tratamento tópico foi ineficiente (GARCIA-CUESTA; SARRION-PEREZ; BAGAN, 2014; MIRANDA-CADENA et al., 2018). Em casos severos de candidíase orofaríngea faz-se o uso de voriconazol, anfotericina B ou as

equinocandinas - caspofungina, micafungina e anidulafungina (PAPPAS et al., 2016). A maioria das espécies de *Candida* spp. tem apresentado boa susceptibilidade frente aos antifúngicos azólicos, no entanto a *C. glabrata* tem sido menos susceptível e a *C. krusei* apresentando resistência intrínseca ao fluconazol (KATHIRAVAN et al., 2012; MIRANDA-CADENA et al., 2018). Existem relatos também de casos de resistência da *C. albicans* frente a anfotericina B e nistatina (MONTEIRO et al., 2019), fluconazol (CHANDRA et al., 2001), itraconazol (GOULART et al., 2018) e cetoconazol (YUMI et al., 2004). glicerol à -18 °C. Para a reativação das cepas, foram inoculados 10 µL da cultura Com o aumento dos casos de resistência antifúngica, surge a necessidade constante de prospecção de novos agentes terapêuticos (PFALLER, 2012), já que o ritmo de desenvolvimento de medicamentos antifúngicos não acompanha o ritmo das necessidades clínicas, especialmente no que tange ao desenvolvimento da resistência fúngica (LEE; LEE, 2018). Nesse sentido, as plantas medicinais representam uma importante fonte para a busca de outros agentes terapêuticos com potencial renovável frente a cepas resistentes (SCORZONI et al., 2016). Nesse sentido, o estudo da atividade antifúngica de óleos essenciais tem apresentado resultados promissores.

Face ao exposto, este estudo tem como objetivo avaliar a atividade antifúngica dos óleos essenciais (**OEs**) de *Pelargonium graveolens* L'Her (gerânio; Geranaceae, **OEGe**), *Cinnamomum cassia* L. (canela; Lauraceae; **OECa**), *Syzygium aromaticum* L. Merr. & L.M. Perry (cravo; Myrtaceae; **OECr**) e *Myristica fragrans* Houtt (noz moscada; Myristicaceae; **OENZ**) frente a *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida lusitaniae* e *Candida tropicalis*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICRORGANISMOS, MANUTENÇÃO E PREPARAÇÃO DO INÓCULO

Os microrganismos utilizados neste estudo são isolados clínicos de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida lusitaniae* e *Candida tropicalis* de pacientes usuários de próteses dentárias (Aprovação no comitê de ética n. 2.236.863, CEP-UFRGS) cedidos pelo Laboratório Biomicolab (Laboratório de Micologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul). Foram escolhidos isolados de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida lusitaniae* e *Candida tropicalis* sensíveis e

resistentes ao fluconazol. As culturas estoque foram mantidas em meio de congelamento Caldo Trypticaseína de Soja (TSB; Himedia®) acrescido de 10% de estoque em tubos contendo Agar Sabouraud dextrose com cloranfenicol (Kasvi®) e incubados a 30 °C por 48 h. Os óleos essenciais empregados foram obtidos de amostras comerciais e através de destilação por arraste de vapor segundo metodologia preconizada pela Farmacopéia Brasileira 4ed. (2009), listados na tabela 1.

Tabela 1: Constituintes químicos dos óleos essenciais.

OEs	Rendimento	Constituintes majoritários	Hidrodestilação
Cravo	6-14%	Eugenol	botões florais secos
Canela	1 %	trans-cinamaldeído	casca
Gerânio	1 a 1,3 %	geraniol linalol citronelol	partes aéreas
Noz moscada	1,6 a 2,7 %	sabineno, terpin-4-ol, miristicina, elimicina e limoneno	sementes

Fonte: FARMACOPÉIA BRASILEIRA 4ed. (2009); BLANK et al., 2012; SWEETMAN, 2011; VORIS et al., 2017.

2.2 SUSCEPTIBILIDADE AOS ÓLEOS

A atividade antifúngica dos óleos foi avaliada pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial *Pelargonium graveolens* L'Her, *Cinnamomum cassia* L. *Syzygium aromaticum* L. Merr. & L.M. Perry, e *Myristica fragrans* Houtt frente as leveduras do gênero *Candida* spp. pelo método de microdiluição em caldo conforme recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (CLSI, 2002; 2007). Os óleos foram dissolvidos em dimetil sulfóxido - DMSO (Nuclear®). Os intervalos utilizados para os óleos essenciais utilizados foram de 1000 a 0,488 µ/ml (MAGIATIS et al., 1999) e de 64 - 0,12 µg/m

para o fluconazol (Polydrug Laboratorie Private Limited/India). A Cultura de *Candida* (10^3 UFC/mL) em RPMI 1640 (Sigma Aldrich®) foram adicionados aos poços de microplaca para detectar a ação do óleo. As microplacas foram incubadas a 30°C e inspecionadas após 24 e 48h para verificação visual do crescimento (CLSI, 2002; 2007; OLIVEIRA et al., 2016). O experimento foi realizado com três repetições. A CIM foi considerada a menor concentração de óleo capaz de inibir completamente o crescimento microbiano visível a olho nu. Para avaliação dos resultados foram utilizados os pontos de corte fluconazol: sensíveis (S) ≤ 8 $\mu\text{g/mL}$, sensíveis dose-dependente (SDD) 16-32 $\mu\text{g/mL}$, resistentes (R) > 64 $\mu\text{g/mL}$ e para os óleos essenciais foi utilizada a definição proposta por Duarte e colaboradores (2005) que considera a atividade antifúngica como forte quando MIC abaixo de 500 $\mu\text{g/m}$, moderada MIC compreendidos entre 510 e 1000 $\mu\text{g/ml}$ e fraca MIC acima de 1100 $\mu\text{g/ml}$ (DUARTE et al., 2005).

2.3 CURVA DE SOBREVIVÊNCIA

O ensaio da curva de morte de *C. glabrata*, *C. albicans*, *C. lusitaniae* e *C. tropicalis* foi realizado como descrito anteriormente (KLEPSER et al., 1998). Uma alíquota de 100 microlitros de um inóculo inicial 10^4 UFC/ mL foi adicionada a placa de 96 poços e posteriormente acrescentado 100 μL de cada óleo essencial nas concentrações de 0,5 e 1 CIM.

As amostras foram incubadas a 30°C por 24h. Foi verificado o número de unidades formadoras de colônia (UFC) nos tempos 0, 6, 12 e 24 h através de diluição seriada. As experiências foram realizadas em triplicata. O limite mínimo de detecção deste método é de 100 UFC/ ml (KLEPSER et al., 1997). Após o período de incubação, o número de células viáveis foi contado e expresso em log de UFC / ml.. Os gráficos da curvas de sobrevivência foram construídos com o auxílio do software Prisma (GRAPHPAD SOFTWARE, 2007). A atividade fungicida é considerada quando verificada uma redução mínima de crescimento de 99,9% do inóculo inicial em 24 h (diminuição do número de UFC/ml maior ou igual a 3 log 10 UFC/ml). (KLEPSER et al., 1997). Sendo assim a atividade fungistática foi considerada quando constatada

uma redução no crescimento menor que 99,9% ou $<3 \log_{10}$ em UFC/ ml a partir do inóculo inicial em 24h de incubação a 30°C.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os óleos essenciais são considerados fontes promissoras para a prospecção de novos agentes terapêuticos frente a cepas resistentes. A atividade antifúngica dos óleos essenciais de cravo, canela, gerânio e noz moscada tem sido objeto de vários estudos (DIAS et al., 2018;

DŽAMIĆ et al., 2014; KERPEL DOS SANTOS, 2018; MAHBOUBI; MAHDIZADEH; HEIDARYTABAR, 2018), estes óleos apresentam grande importância econômica, sendo utilizados na indústria de alimentos e na área de cosméticos.

Os resultados referentes à CIM dos óleos essenciais estão dispostos na tabela 2.

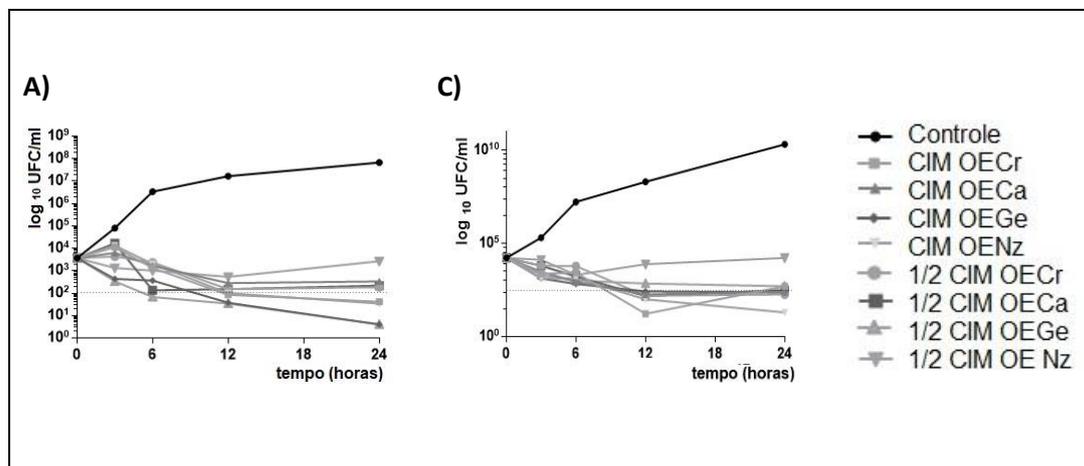
Observou-se que todas as cepas avaliadas foram sensíveis aos óleos de *Cinnamomum cassia* L. (canela; Lauraceae; **OECa**) de *Syzygium aromaticum* L. Merr. & L.M. Perry (cravo; Myrtaceae; **OECr**) *Pelargonium graveolens* L'Her (gerânio; Geranaceae, **OEGe**) e *Myristica fragrans* Houtt (noz moscada; Myristicaceae; **OENZ**), apresentando forte ($CIM \leq 500 \mu\text{g/ml}$) ou moderada atividade antifúngica ($CIM \leq 1000 \mu\text{g/ml}$). Os melhores resultados foram obtidos com os óleos de cravo e canela com CIM de 250 a 15,62 $\mu\text{g/ml}$ para cravo e 500 a 15,62 $\mu\text{g/ml}$ para canela frente as cepas avaliadas. Os óleos de gerânio e noz moscada apresentaram forte atividade antifúngica para 10 dos isolados clínicos estudados e moderada atividade antifúngica frente a um isolado de *C.glabrata*.

Tabela 2: Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais (OEs) de OECa, OECr OEGe e OENZ

Isolados Clínicos	CIM (µg/ml)				
	OECa	OECr	OEGe	OENZ	Fluconazol
<i>C. albicans</i> C21	500	250	500	500	2
<i>C. albicans</i> M39	15,62	31,25	125	250	0,25
<i>C. albicans</i> M42	31,25	31,25	62,5	250	16
<i>C. albicans</i> M46	125	31,25	125	250	>64
<i>C. glabrata</i> M40	62,5	15,62	250	125	0,5
<i>C. glabrata</i> M47	500	250	1000	1000	8
<i>C. lusitanae</i> M08	31,25	62,5	250	250	1
<i>C. lusitanae</i> M23	250	125	125	250	2
<i>C. tropicalis</i> M20	125	250	500	31,25	2
<i>C. tropicalis</i> M32	15,62	62,5	62,5	125	64
<i>C. tropicalis</i> M45	125	31,25	125	500	2
Média	161,64	103,69	284,09	321,02	

Para o fluconazol é interpretado como sensíveis (S) $\leq 8 \mu\text{g/mL}$, sensíveis dosedependente (SDD) $16\text{-}32 \mu\text{g/mL}$, resistentes (R) $> 64 \mu\text{g/mL}$ (CLSI, 2007). Como atividade antifúngica forte quando CIM abaixo de $500 \mu\text{g/mL}$, moderada CIM compreendidos entre 510 e $1000 \mu\text{g/mL}$ e fraca CIM acima de $1100 \mu\text{g/mL}$ (DUARTE et al., 2005).

Nos ensaios para determinação de curva de sobrevivência estão apresentados os valores de log de UFC/ mL em função do tempo (Figura 1). A análise destes dados para *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.tropicalis* e *C.lusitaniae* demonstrou efeito fungicida nas concentrações de $0,5$ CIM e CIM, após 6 h, de acordo com os critérios estabelecidos por Klepser e colaboradores (1997), diminuição na concentração de UFC, expressa em \log_{10} UFC/mL é ≥ 3 . (Figura 1).



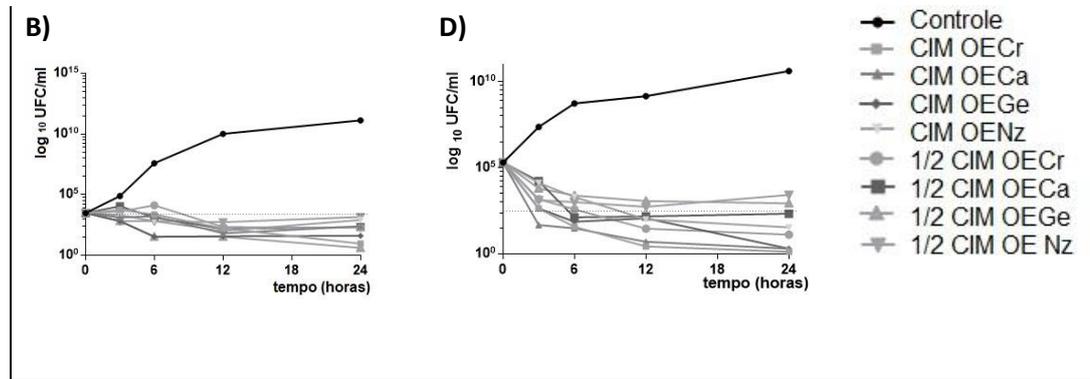


Figura 1: Curva de sobrevivência A) *C. albicans* M39; B) *C. tropicalis* M45; C) *C. glabrata* M40; e D) *C. lusitaniae* M08 para o óleo de cravo, canela, gerânio e noz moscada nas concentrações de CIM e 1/2 CIM.

A atividade antifúngica do óleo essencial de gerânio foi avaliada frente a cepas de *C. albicans* apresentando um CIM de 250 µg/ml (DŽAMIĆ et al., 2014), e frente *Candida* spp. em pesquisa desenvolvida por Essid e colaboradores (2017) obtendo resultados de CIM entre 500 e 250 µg/ml para 10 dos 11 isolados estudados (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. riferii*) e um CIM de 1000 CIM µg/ml para uma cepa de *C. albicans*. e CIM de 256 a 128 µg/ml em estudos prévios pelo nosso grupo de pesquisa onde foram analisados óleos provenientes de diferentes regiões frente a *Candida* spp. (KERPEL DOS SANTOS, 2018), que corroboram com os resultados obtidos neste estudo, onde obtivemos a CIM entre 500 a 125 µg/ml frente a *C. albicans*. O óleo de gerânio obtido através de hidrodestilação das partes aéreas da planta apresenta um rendimento de 1 a 1,3 % (BLANK et al., 2012) e seus principais constituintes são o geraniol, citronelol e linalol (MAHBOUBI; MAHDIZADEH; HEIDARYTABAR, 2018; MOUTAOUAFIQ et al., 2019). Estudos recentes atribuem a sua atividade antifúngica ao geraniol, citronelol (MAHBOUBI; MAHDIZADEH; HEIDARYTABAR, 2018) e linalol (DIAS et al., 2018).

O óleo de cravo já apresentou atividade antifúngica frente a *Candida* spp., *Aspergillus* spp. e espécies de dermatófitos (PINTO et al., 2009). Quando testado frente a *C. albicans* apresentou CIM de 93 a 77 µg/ml (PINTO et al., 2009). Em nosso estudo obtivemos valores de CIM de 250 a 31,25 µg/ml para *C. albicans* e valores de 250 a 15,62 µg/ml para as outras espécies avaliadas (não-*albicans*). O óleo volátil obtido por hidrodestilação, a partir de botões florais secos é constituído

majoritariamente de eugenol, em torno de 85% (FARMACOPÉIA, 2010), um estudo anterior constatou a ação antifúngica deste com valores de CIM entre 67 a 19 µg/ml para o eugenol, o que condiz com os valores de CIM do óleo quando verificado sua constituição química (PINTO et al., 2009).

A atividade antifúngica do óleo essencial de *C. cassia* (canela) frente a *C. albicans* ATCC 90029 obteve valores de CIM de 500 µg/ml /mL (GIORDANI et al., 2006), e em outro estudo quando avaliado frente a *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei* apresentou CIM de 138, 225, 450 e 110 µg/ml respectivamente (OOI et al., 2006), e CIM de 62,5 µg/ml frente a *C. glabrata* resistente ao fluconazol (ALMEIDA et al., 2017). Estes dados corroboram com nossos resultados onde obtivemos valores de CIM de 500 a 31,25 µg/ml para *C. albicans*, de 125 a 15,62 µg/ml para *C. tropicalis* e de 500 a 62,5 µg/ml para *C. glabrata*, onde verificouse forte atividade antifúngica para todas as espécies pesquisadas estando de acordo com Duarte e colaboradores (2005), onde a CIM deve ser considera abaixo de 500 µg/ml. O óleo essencial de *Cinammomum. cassia* L pode ser extraído de folhas ou ramos jovens e é constituído predominantemente por trans-cinamaldeído e possui um rendimento mínimo de 1% (FARMACOPÉIA, 2010).

O óleo essencial de noz moscada proveniente das Ilhas de Andamão quando testado frente a *C. albicans* não demonstrou atividade pelo método de Kirk Bauer (PAL. MAHESH. et al., 2011). Estes dados diferem dos nossos resultados onde verificamos forte atividade antifúngica. Isso pode ser explicado pelos diferentes níveis de miristicina e elimicina nos dois óleos. Esta composição química divergente poderia ser resultado de vários parâmetros como estágio de desenvolvimento da planta, origem geográfica, condições de armazenamento, temperatura, nutrição (CHATZOPOULOU; KATSIOTIS, 1995).

A análise destes dados para *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. lusitaniae* mostrou efeito fungicida nas concentrações de ½ CIM e CIM, após 6 h, de acordo com os critérios estabelecidos por Klepser e colaboradores (1997), diminuição na concentração de UFC, expressa em \log_{10} UFC/mL é ≥ 3 . (Figura 1). Observou-se também um aumento do número UFC/ml na *C. tropica*

O mecanismo de ação dos óleos essenciais tem sido investigado em vários estudos (ESSID et al., 2017; MIRON et al., 2014; NAZZARO et al., 2017). A natureza lipofílica dos componentes terpenóides pode provocar rupturas nas membranas das células fúngicas levando à morte das mesmas (NAZZARO et al., 2017); a ligação dos monoterpenos ao ergosterol ocasionando a desestabilização das membranas celulares dos fungos (MIRON et al., 2014), pela inibição da biossíntese do ergosterol (ESSID et al., 2017); bloqueando o crescimento de leveduras como *Candida albicans*, através da inibição do seu crescimento na fase S do ciclo celular, atuando na via de sinalização da morfogênese das pseudohifas ou impedindo a formação de biofilmes resistentes aos fármacos utilizados no tratamento de infecções causadas por espécies de *Candida* spp. (AGARWAL; LAL; PRUTHI, 2008).

Os OEs analisados possuem rendimentos de extração de 1 a 14%, sendo portanto um recurso viável e renovável. Diante do exposto, os óleos essenciais de cravo, canela, gerânio e noz moscada apresentaram efeitos positivos frente a inibição do crescimento de *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.tropicalis* e *C.lusitaniae*, constituindo uma alternativa para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos no tratamento da candidíase. Entretanto, outros estudos devem ser realizados como toxicidade, desenvolvimento de formulações, determinação de concentrações ideais, cinética de crescimento, interações farmacológicas, antes que possam serem aplicados na clínica odontológica.

CONCLUSÃO

Os óleos essenciais estudados apresentaram promissora atividade antifúngica frente aos isolados clínicos de *Candida* spp sensíveis e resistentes ao fluconazol.

4. REFERÊNCIAS

ABU-ELTEEN, K. H.; HAMAD, M. A.; SALAH, S. A. Prevalence of oral *Candida* infections in diabetic patients. **Bahrain Medical Bulletin**, v. 28, n. 1, 2006.

AGARWAL, V.; LAL, P.; PRUTHI, V. Prevention of *Candida albicans* biofilm by plant oils. **Mycopathologia**, v. 165, n. 1, p. 13–19, 2008.

ALMEIDA, L. D. F. D. et al. Atividade inibitória de óleos essenciais vegetais frente á *Candida glabrata*, resistente a Fluconazol. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 21, n. 2, p. 131–138, 2017.

BLANK, A. F. et al. Plant spacing and harvest intervals on biomass and essential oil of geranium | Espaçamento de plantio e intervalos de colheita na biomassa e no óleo essencial de gerânio. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 740–746, 2012.

CHANDRA, J. et al. Antifungal resistance of *Candida* biofilms formed on denture acrylic in vitro. **Journal of Dental Research**, v. 80, n. 3, p. 903–908, 2001.

CHATZOPOULOU, P. S.; KATSIOTIS, S. T. Procedures influencing the yield and the quality of the essential oil from *Juniperus communis* L. berries. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 70, n. 3, p. 247–253, 1995.

CLSI, CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. M44-A2: Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline—Second Edition. **CLSI document**, 2009.

CLSI, CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Clinical and Laboratory Standards Institute: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard-; CLSI document M27-A3. v. 28, 2012

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 599–607, 2003.

DARWAZEH, A. M.-G.; AL-REFAI, S.; AL-MOJAIWEL, S. Isolation of *Candida* species from the oral cavity and fingertips of complete denture wearers. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 86, n. 4, p. 420–423, 1 out. 2001.

DIAS, I. J. et al. Antifungal activity of linalool in cases of *Candida* spp. isolated from individuals with oral candidiasis. **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 2, p. 368–374, 2018.

DUARTE, M. C. T. et al. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 305–311, 2005.

DŽAMIĆ, A. M. et al. Chemical composition, antifungal and antioxidant activity of *Pelargonium graveolens* essential oil. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 4, n. 3, p. 1–5, 2014.

ESSID, R. et al. Antifungal mechanism of the combination of *Cinnamomum verum* and *Pelargonium graveolens* essential oils with fluconazole against pathogenic *Candida* strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 18, p. 6993–7001, 2017.

FARAH, C. S.; LYNCH, N.; MCCULLOUGH, M. J. Oral fungal infections: an update for the general practitioner. **Australian dental journal**, v. 55, n. 1, p. 48–54, 2010.

FARMACOPÉIA, A. N. D. V. S. Farmacopeia Brasileira. **Farmacopeia Brasileira, 5ª edição**, v. 1, p. 1–523, 2010.

GARCIA-CUESTA, C.; SARRION-PEREZ, M. G.; BAGAN, J. V. Current treatment of oral candidiasis: A literature review. **J Clin Exp Dent**, v. 6, n. 5, p. e576-82, 2014.

Brazilian Journal of health Review

GERMANO, V. E. et al. Microrganismos habitantes da cavidade oral e sua relação com patologias sistêmicas: revisão da Literatura. **Revista de Ciências da Saúde Nova Esperança**, v. 16, n. 2, p. 91–99, 2018.

GIORDANI, R. et al. Potentiation of antifungal activity of amphotericin B by essential oil from *Cinnamomum cassia*. **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 1, p. 58–61, 2006.

GOULART, L. S. et al. Oral colonization by *Candida* species in HIV-positive patients: association and antifungal susceptibility study. **Einstein (São Paulo)**, v. 16, n. 3, p. 1–6, 2018.

GRAPHPAD SOFTWARE. **GraphPad PRISM6.0**, 2007.

HANI, U. et al. Candidiasis: A fungal infection- current challenges and progress in prevention and treatment. **Infectious Disorders - Drug Targets**, v. 15, n. 1, p. 42–52, 2015.

KADIR, T.; UYGUN, B.; AKYÜZ, S. Prevalence of *Candida* species in Turkish children: relationship between dietary intake and carriage. **Archives of Oral Biology**, v. 50, n. 1, p. 33–37, 1 jan. 2005.

KATHIRAVAN, M. K. et al. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 2012.

KERPEL DOS SANTOS, M. Estudo dos óleos essenciais de espécies de *Pelargonium* (Geraniaceae) e de suplementos alimentares e compostos emagrecedores contendo 1,3- dimetilamilamina: uma abordagem química, antifúngica e forense. **Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.**, 2018.

KLEPSEK, M. E. et al. Antifungal pharmacodynamic characteristics of fluconazole and amphotericin B tested against *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 6, p. 1392–1395, 1997.

KLEPSEK, M. E. et al. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: Proposal for standardized methods. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 5, p. 1207–1212, maio 1998.

LEE, H.; LEE, D. G. Novel Approach into Efficient Antifungal Drug Action. **Journal of microbiology and biotechnology**, 2018.

LEITE, D. P.; PIVA, M. R.; MARTINS FILHO, P. R. S. Identificação das espécies de *Candida* em portadores de estomatite protética e avaliação da susceptibilidade ao miconazol e à terapia fotodinâmica. **Rev Odontol UNESP. Jan.-Feb.**, v. 44, n. 1, p. 12–17, 2015.

MAGIATIS, P. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Pistacia lentiscus* var. chia. **Planta Medica**, v. 65, n. 8, p. 749–752, 1999.

MAHBOUBI, M.; MAHDIZADEH, E.; HEIDARYTABAR, R. The anti-candidal activity of *Pelargonium graveolens* essential oils against clinical isolates of *Candida albicans*. **Infectio**, v. 22, n. 1, p. 9–12, 2018.

MARCOS-ARIAS, C. et al. Isolation of *Candida dubliniensis* in denture stomatitis. **Archives of Oral Biology**, v. 54, n. 2, p. 127–131, 2009.

MIRANDA-CADENA, K. et al. Prevalence and antifungal susceptibility profiles of *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and their close-related species in oral candidiasis. **Archives of Oral Biology**, v. 95, n. 1, p. 100–107, 2018.

MIRON, D. et al. Antifungal activity and mechanism of action of monoterpenes against dermatophytes and yeasts. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 24, n. 1, p. 660–667, 2014.

MONTEIRO, L. C. et al. *Candida* on oral cavity of pediatric individuals with ALL and its susceptibility to nystatin and amphotericin B. **RGO - Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 67, 2019.

MOUTAOUAFIQ, S. et al. **Antifungal Activity of Pelargonium graveolens Essential Oil and its Fractions Against Wood Decay Fungi** *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 2019. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/0972060X.2019.1646164?needAccess=true>>
NAZZARO, F. et al. **Essential oils and antifungal activity** *Pharmaceuticals*, 2017.

OLIVEIRA, L. B. S. et al. Atividade antifúngica e possível mecanismo de ação do óleo essencial de folhas de *ocimum gratissimum* (linn.) sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 2, p. 511–523, 2016.

OOI, L. S. M. et al. Antimicrobial activities of *Cinnamon* oil and cinnamaldehyde from the Chinese medicinal herb *Cinnamomum cassia* Blume. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 34, n. 3, p. 511–522, 2006.

PAL. MAHESH. et al. Composition and anti-microbial activity of essential oil of *Myristica fragrans* from Andaman Nicobar Island. **INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACY & LIFE SCIENCES**, v. 2, n. 10, p. 1115–1117, 2011.

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: Mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **American Journal of Medicine**, v. 125, n. 1 SUPPL., 2012.

PINTO, E. et al. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 11, p. 1454–1462, 2009.

REINHARDT, L. C. et al. Sensitivity to antifungals by *Candida* spp samples isolated from cases of chronic atrophic candidiasis (CAC) **Brazilian Journal of Biology**. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151969842019005007103&tlng=en>. Acesso em: 18 out. 2019

SAMARANAYAKE, Y. H.; SAMARANAYAKE, L. P. Experimental oral candidiasis in animal models. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 398–429, 2001.

SCORZONI, L. et al. Searching new antifungals: The use of in vitro and in vivo methods for evaluation of natural compounds. **Journal of Microbiological Methods**, v. 123, n. 1, p. 68– 78, 2016.

SCULLY, C.; EI-KABIR, M.; SAMARANAYAKE, L. P. *Candida* and oral candidosis: A review. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, 1994.

SILVA, F. C. et al. Prevalence of *Candida* yeasts in oral samples from children with AIDS and children exposed and not exposed to HIV served by SUS in the state of Bahia, Brazil. **RGO - Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 63, n. 1, p. 07–12, 2015.

SWEETMAN, C. **Martindale. The Complete Drug Reference - 37th**, 2011.

VALENTE, V. M. M. et al. Composition and antifungal activity of the brazilian *Myristica fragrans* houtt essential oil. **Journal of Food Safety**, v. 31, n. 3, p. 197–202, 2011.

VORIS, D. G. DA R. et al. Estudos Etnofarmacológicos de óleos essenciais com atividade larvicida contra o Mosquito *Aedes Aegypt*. **Semioses**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2017.

YUMI, C. et al. In vitro antifungal susceptibility of *Candida* spp . isolates from patients with chronic periodontitis and from control patients Suscetibilidade in vitro aos antifúngicos em cepas de *Candida* spp . isoladas de pacientes com periodontite crônica e de indivíd. **In Vitro**, v. 18, n. 1, p. 2–6, 2004.

8. MANUSCRITO IV:

Antibiofilm activity of the essential oil of *Pelargonium graveolens* L'Her, *Cinnamomum cassia* L., *Syzygium aromaticum* L. Merr. & L.M. Perry and *Myristica fragrans* Houtt in clinical isolates of *Candida* spp.

Entre as páginas 114 e 134 encontra-se o manuscrito IV intitulado Antibiofilm activity of the essential oil of *Pelargonium graveolens* L'Her, *Cinnamomum cassia* L., *Syzygium aromaticum* L. Merr. & L.M. Perry and *Myristica fragrans* Houtt in clinical isolates of *Candida* spp. avalia a atividade antibiofilme dos essenciais de *Pelargonium graveolens* L'Her (gerânio; Geranaceae), *Cinnamomum cassia* L. (canela; Lauraceae), *Syzygium aromaticum* L. Merr. & L.M. Perry (cravo; Myrtaceae) and *Myristica fragrans* Houtt (noz moscada; Myristicaceae) frente a isolados clínicos de *Candida* spp provenientes da mucosa oral de pacientes do Hospital de Odontologia da UFRGS. O mesmo foi suprimido pois será submetido a revista científica..

9. MANUSCRITO V:

Fingerprint-MS of clinical isolates of Candida by MALDI-TOF MS

Entre as páginas 136 e 146 encontra-se o manuscrito V, Fingerprint-MS of clinical isolates of *Candida* by MALDI-TOF MS. avalia o perfil da impressão digital- MS de isolados clínicos de *Candida* spp provenientes da mucosa oral de pacientes do Hospital de Odontologia da UFRGS identificados por MALDI-TOF. O mesmo foi suprimido pois será submetido a revista científica.

A cavidade oral possui um ecossistema muito complexo abrigando diferentes microrganismos, os quais permanecem em comunidades simbióticas com o hospedeiro, mas também são capazes de desenvolverem uma série de doenças em determinadas situações (FRÉDÉRIC, MICHEL, SELENA, 2018; TAKAHASHI, 2005). A *Candida* é o fungo comensal mais freqüente na cavidade oral, e é reconhecida por ser a principal causa de candidíase oral. Em uma mucosa oral saudável a frequência das espécies de *Candida* varia entre 60 e 70%, e normalmente não desencadeiam processos patológicos (PAIXÃO DA SILVA et al., 2015).

No manuscrito I, a prevalência de *Candida* spp. foi menor que a encontrada na maioria dos dados da literatura (BIANCHI et al., 2016; PAIXÃO DA SILVA et al., 2015), 35 (58,33%) no grupo de usuários de prótese dentária removível e 20 (33,33%) no grupo controle, entretanto se assemelha ao estudo de Al-Shamahy (2018) que avaliou 200 pacientes saudáveis do Hospital de Odontologia do Yemem e observou uma prevalência de 61,50% em pacientes usuários de prótese dentária e 33,60% no grupo controle. Esse achado pode ser ocasionado devido à natureza do grupo amostral do presente estudo. Os pacientes do estudo atendidos pelas disciplinas de Clínica Odontológica realizam a manutenção de suas próteses ou fazem a substituição da mesma, com isso são atendidos uma vez por semana e recebem a revisão constante.

Outros estudos semelhantes ao manuscrito I, incluem o de Paixão da Silva e colaboradores (2015) que avaliaram pacientes usuários de prótese dentária em Cruz das Almas, Bahia, Brasil e observaram uma frequência de 77,27% de *Candida* spp. em usuários de próteses dentárias e 29,72% no grupo controle (PAIXÃO DA SILVA et al., 2015). Bianchi e colaboradores (2016) avaliaram 91 idosos do Centro de Idosos Padre Firmo Pinto Duarte Filho, fundação filantrópica Abrigo do Bom Jesus de Cuiabá e em instituições privadas, Clínica de Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de Cuiabá (UNIC) e Clínica Três Américas Ltda encontrando uma prevalência de *Candida* spp. de 83,30% em pacientes usuários de próteses dentárias e 53,50% no grupo controle. Entre os pacientes com manifestações clínicas de candidíase oral 83,30% pertenciam ao grupo que usava próteses dentárias removíveis, enquanto apenas 16,70% pertenciam ao grupo controle (BIANCHI et al., 2016).

Alguns estudos relacionam a presença de *Candida* spp. na cavidade oral com o uso prolongado de antibióticos de largo espectro, corticosteroides e psicotrópicos,

neoplasias malignas (PAIXÃO DA SILVA et al., 2015), deficiência nutricional, anemia (PAILLAUD et al., 2004), presença de *diabetes mellitus* (BENITO-CRUZ et al., 2016; PAIXÃO DA SILVA et al., 2015), síndrome da imunodeficiência adquirida (BRITO et al., 2011; BYADARAHALLY RAJU, RAJAPPA, 2011; WINGETER et al., 2007), consumo de álcool, tabagismo (PAIXÃO DA SILVA et al., 2015), gênero, idade acima de 60 anos, baixa escolaridade (LYON et al., 2006) e uso de prótese dentária (AL-SHAMAHY, 2018; BIANCHI et al., 2016; LYON et al., 2006; PAIXÃO DA SILVA et al., 2015; STRAMANDINOLI et al., 2010). No presente estudo foi observado uma correlação entre diabetes, uso de prótese dentária e idade acima de 60 anos, corroborando com os dados encontrados na literatura.

A prevalência de *Candida* spp. no paciente diabético com bom controle glicêmico não difere dos demais indivíduos. No entanto, o estresse pode descompensar os níveis glicêmicos do paciente temporariamente, ocorrendo uma diminuição da resposta à infecção fúngica (PETROVIC et al., 2019; PRADO; VACCAREZZA, 2013). Essa maior propensão é decorrente da hiperglicemia e da cetoacidose que altera a fagocitose dos macrófagos e a quimiotaxia dos neutrófilos (PRADO; VACCAREZZA, 2013). A hipossalivação, verificada em 30% dos pacientes diabéticos pode causar úlceras, fissuras na língua e dificuldade de retenção das próteses. Essas lesões podem predispor a infecções (MARTINEZ et al., 2013b; VERNILLO, 2003). No descontrole metabólico ocorre um agravamento da hipossalivação devido ao aumento dos gradientes osmóticos nos vasos sanguíneos causados pela hiperglicemia, inibindo a secreção de saliva (PRADO; VACCAREZZA, 2013).

A maior prevalência de candidíase oral em pacientes idosos está relacionada a diminuição das defesas imunológicas, utilização de medicamentos de uso contínuo e uso de próteses dentárias (THIYAHUDDIN et al., 2019). Medicamentos hipoglicemiantes, antidepressivos, antitireoidianos que podem inibir a secreção de saliva (CASTRO-SILVA et al., 2017; THIYAHUDDIN et al., 2019). A inalação de corticóides na asma e doença pulmonar obstrutiva pode ocasionar a imunossupressão nas vias aéreas respiratórias superiores causada pela deposição de partículas do fármaco na orofaringe (CHENG et al., 2017).

O mecanismo pelo qual o tabagismo favorece a colonização de *Candida* spp. não está bem estabelecido, sugere-se que a menor taxa de fluxo salivar em fumantes

acrescidos de um ambiente ácido pode favorecer a colonização e o crescimento de *Candida* spp. associado a diminuição da imunoglobulina salivar (IgA) com depressão da função dos neutrófilos (VILA et al., 2020). Considerando um aumento da incidência de hipofunção salivar com o aumento da idade populacional e o uso de medicamentos como hipoglicemiantes, antidepressivos, antitireoidianos (CASTRO-SILVA et al., 2017), utilizado por 33% da população avaliada neste estudo, a característica da população avaliada pode ter mascarado a correlação entre usuários de prótese dentária e o tabagismo,

A maior colonização das superfícies das próteses em comparação com a mucosa também foi encontrada em estudos anteriores (BARBOSA; SOUZA; ANJOS, 2001; LEITE; PIVA; MARTINS FILHO, 2015), destacando a importância da higienização da prótese dentária como parte efetiva no tratamento da candidíase nestes pacientes. No presente estudo no grupo dos usuários de prótese dentária o material proveniente da coleta na mucosa palatina gerou 39 isolados de *Candida* spp. e no material proveniente das próteses, 50 isolados. No grupo controle foram 21 isolados.

Avaliando as características das próteses, o presente estudo verificou correlação entre a colonização de *Candida* spp. e o tempo de uso da prótese dentária, a qual foi maior nos pacientes com o uso acima de dez anos e também a utilização de duas próteses dentárias com prótese parcial na arcada dentária superior. Estudos semelhantes como o de Lira e Torres (2018) avaliaram 240 participantes usuários de próteses dentárias e verificaram correlação entre candidíase e a utilização de próteses inadequadas ou mal adaptadas, o uso das mesmas por mais de 10 anos e a utilização de próteses em ambos os arcos (DE LIRA; TORRES, 2018). Stramandinoli e colaboradores (2010) com 160 pacientes internados em dois hospitais universitários da Pontifícia Universidade Católica do Paraná em Curitiba verificou relação significativa com a presença de candidíase bucal com o tempo de uso da prótese e o uso contínuo da mesma (STRAMANDINOLI et al., 2010). Dessa forma, os dados encontrados no presente estudo são consistentes com os encontrados na literatura. Neste estudo verificou-se a correlação entre a idade da prótese (+ de 10 anos) e a prevalência de *Candida* spp. (X^2 0,4204, gl 1, p 0,5167), não sendo possível associar a necessidade de ajuste, hábito de dormir com a prótese ou ao tipo de prótese. Nossos dados diferem de estudos anteriores para a associação de *Candida* spp. com a

necessidade de ajuste e ao hábito de dormir com a prótese (STRAMANDINOLI et al., 2010; (DE LIRA; TORRES, 2018) e a utilização de duas próteses (DE LIRA; TORRES, 2018). Essa diferença pode ter sido ocasionada, devido a diferenças nas informações fornecidas pelo paciente

No manuscrito I, a *Candida albicans* foi a espécie mais prevalente nos usuários de prótese dentária (47,36%) e no grupo controle (55,00%), corroborando com outros estudos já realizados (ISHIKAWA et al., 2015; LEITE; PIVA; MARTINS FILHO, 2015; LYON et al., 2006; MARCOS-ARIAS et al., 2009). Marcos-Arias e colaboradores (2009) com 100 pacientes usuários de prótese, com e sem estomatite protética; Lyon e colaboradores (2006) com 112 usuários de prótese e 103 indivíduos com dentição natural, Leite; Piva e Martins Filho (2015) com 46 pacientes portadores de estomatite protética atendidos na Universidade Federal de Odontologia do Sergipe e Ishikawa e colaboradores (2015) com 56 pacientes usuários de prótese dentária sem sintomas clínicos. Todos encontraram a *C. albicans* como a espécie mais recorrente 73,40%, 65,10%, 53,33% e 92,00% respectivamente. Em contrapartida, Silva e colaboradores (2019) avaliaram 40 isolados de mucosa palatina e prótese dentária em idosos na Comunidade Lago do Limão no município de Iranduba, Amazonas e obtiveram uma prevalência de 80,00% das espécies de *Candida não-albicans*, diferindo de estudos anteriores.

A literatura reporta que a *C. tropicalis*, *C. krusei* (LEITE; PIVA; MARTINS FILHO, 2015; MARCOS-ARIAS et al., 2009; PAIXÃO DA SILVA et al., 2015), *C. glabrata* (MARCOS-ARIAS et al., 2009; SATO et al., 2017; SILVA et al., 2019), *C. parapsilosis* (SATO et al., 2017; SILVA et al., 2019; SOARES DA SILVA et al., 2018) como as espécies de *Candida não-albicans* de maior frequência em mucosa oral e a presença de espécies menos recorrentes como *C. famata*, *C. guilhermondii*, *C. dubliniensis* (MARCOS-ARIAS et al., 2009) *C. lusitaniae*, *C. nivariensis* (GUPTA et al., 2019; SHAFI; PADMARAJ; MULLESSERY, 2015) e *C. kefyr* (CHANDRA KANTHETI et al., 2012). No presente estudo as espécies de *Candida não-albicans* mais prevalentes foram *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* e *C. glabrata* nos usuários de próteses dentárias. Nos pacientes do grupo controle também foram isoladas as *C. guilhermondii*, *C. intermedia* e *C. krusei*.

Nos pacientes que apresentaram flora mista, todos possuíam algum tipo de doença pré-existente como diabetes, hipertireoidismo, reumatismo ou asma, ou seja, pacientes com maior pré-disposição a infecção. Desta forma os dados encontrados neste estudo são consistentes quando comparados com os encontrados na literatura (PAIXÃO DA SILVA et al., 2015; SATO et al., 2017; SOARES DA SILVA et al., 2018). No trabalho de Paixão da Silva e colaboradores (2015) foi verificado flora mista composta por 2 ou 3 espécies de *Candida* spp. A mais prevalente foi *C. albicans* e *C. tropicalis* (92,27%), seguida de *C. krusei* e *C. tropicalis* e associação de *C. krusei*, *C. albicans* e *Candida* spp. (2,27%) em usuários de prótese. Em não usuários, a presença concomitante de *C. albicans* e *C. tropicalis* foi verificada. Soares da Silva e colaboradores (2018) com 68 pacientes usuários de próteses dentárias removíveis, atendidos em uma clínica de odontologia de uma universidade 15 (22,05%) dos pacientes apresentavam flora mista, destes 46,66% *C. albicans* e *C. glabrata*, *C. albicans* e *C. tropicalis*; *C. albicans* e *C. parapsilosis* a associação de 3 espécies *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*; *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* (SOARES DA SILVA et al., 2018). Sato e colaboradores (2017) examinaram a parte dorsal da língua em 162 idosos moradores da comunidade de Otsuchi, sobreviventes do Tsunami e verificaram que a *C. albicans* foi a espécie mais frequente seguida por *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. Uma combinação de *C. albicans* e *C. glabrata* foi encontrada em 23,50% dos portadores de *Candida* spp.. Sato e colaboradores (2017) observaram diferenças no tempo de colonização por *C. albicans* e não-*albicans* nos indivíduos que possuíam flora mista sugerindo uma progressão na colonização por *Candida* spp. (SATO et al., 2017). Ainda no presente estudo também foi verificado a presença de flora mista em 7 pacientes do grupo usuários de prótese dentária e 1 do grupo controle. A associação mais prevalente foi *C. albicans* e *C. lusitaniae* encontradas em 4 pacientes representando 57,14% das associações, seguida de *C. albicans* e *C. tropicalis*; *C. tropicalis* e *C. lusitaniae* e uma flora com a associação de 3 espécies, *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. guilhermondii*. No grupo controle constatou-se a presença de flora mista de *C. albicans* e *C. guilhermondii* em um paciente.

Como a suscetibilidade antifúngica pode variar entre os isolados de uma mesma espécie de *Candida* spp., uma identificação precisa deste perfil pode auxiliar na escolha terapêutica e a clínica (SANITÁ et al., 2013). Lyon e colaboradores (2008)

avaliaram 109 isolados de pacientes com e sem prótese dentária frente ao fluconazol e itraconazol e não verificaram diferença entre o perfil de susceptibilidade entre os dois grupos. Wingeter e colaboradores (2007) com 58 isolados clínicos de orofaringe provenientes de pacientes HIV positivos com diferentes contagens de células CD4 não constataram diferenças na susceptibilidade para fluconazol, itraconazol, cetoconazol e nistatina entre os grupos. Quanto aos resultados do perfil de susceptibilidade dos isolados de *Candida* spp. provenientes da mucosa palatina dos pacientes com e sem prótese do presente estudo, não houve diferença entre as amostras obtidas dos usuários de próteses dentárias removíveis e do grupo controle quanto à susceptibilidade aos antifúngicos azólicos, corroborando com os estudos anteriores (LYON et al., 2008a; WINGETER et al., 2007). Porém foi encontrado apenas diferença para a nistatina diferindo do estudo de Wingeter e colaboradores (2007), que comparam dois grupos de pacientes imunocomprometidos com diferentes contagens de CD4 e em outros estudos descritos abordaram somente a susceptibilidade dos isolados frente a anfotericina B (LYON et al., 2008a; SANITÁ et al., 2013).

Quanto a resistência, dos 59 isolados da mucosa palatina dos pacientes do Hospital de Odontologia da UFRGS, foram obtidos 14 (23,72%) resistentes ao fluconazol, 12 (20,33%) resistentes ao itraconazol, 5 (8,47%) ao cetoconazol, e 1 (1,69%) a nistatina. Em relação a resistência ao cetoconazol, no presente estudo verificou-se que 19,04% de *C. albicans* (CIM de 1 a 4 µg/mL), 14,28% de *C. tropicalis* (CIM 1 µg/mL), 16,66% de *C. lusitaniae* (CIM 1 µg/mL) e 25,00% de *C. glabrata* (CIM 1 µg/mL) eram resistentes ao itraconazol nos usuários de prótese dentária, corroborando com os resultados dos estudos anteriores para *C. tropicalis* e *C. glabrata* desenvolvidos por Marcos-Arias (2012) e Sanitá e colaboradores (2013). No entanto, foi observado 12 (20,33%) isolados resistentes de *Candida* spp., percentual maior que o encontrado por Marcos-Arias e colaboradores (2012) e Sanitá e colaboradores (2013), se assemelhando aos resultados obtidos em pacientes imunocomprometidos (LUQUE et al., 2009; WINGETER et al., 2007). Sanitá e colaboradores (2013) verificaram que 3,40% dos isolados clínicos de *C. albicans* e 5,00% de *C. tropicalis* eram resistentes ao itraconazol, com valores de CIM que variaram de 4 a 32 µg/mL para a *C. albicans* e 1 µg/mL para a *C. tropicalis* e não verificaram resistência ao fluconazol, no entanto 3,40% dos isolados clínicos de *C. albicans* e 60,00% dos de *C.*

glabrata eram suscetíveis dose dependente com valores de CIM que variaram de 12 a 32 µg/mL e 16 a 48 µg/mL, respectivamente (SANITÁ et al., 2013). Em outro estudo de suscetibilidade *in vitro* dos isolados clínicos de *Candida* spp. em pacientes usuários de prótese dentária verificaram que 5,90% dos isolados de *C. albicans*, 11,10% de *C. tropicalis* e 33,30% de *C. glabrata* eram resistentes ao itraconazol (MARCOS-ARIAS et al., 2012).

No presente estudo, 27,27% dos isolados de *Candida albicans* (CIM de 8-64 µg/mL) e 29,41% de *Candida não-albicans* foram resistentes ao fluconazol (*C. tropicalis* e *C. Krusei*) com CIM de 16-32 µg/mL. Dados semelhantes obtidos por Benito-Cruz e colaboradores (2016) verificaram a suscetibilidade em 120 isolados da mucosa oral em idosos e verificaram também que 20,30% de *C. albicans* e 15,30% de *C. não-albicans* eram sensível dose dependente e ainda, 17,90% resistentes ao fluconazol. Observaram também um aumento na resistência com o aumento da faixa etária em mulheres mexicanas estudadas (BENITO-CRUZ et al., 2016). Terças e colaboradores (2017) avaliaram isolados de *Candida* spp. a partir da mucosa oral de 58 pacientes internados sob terapia antiviral no Hospital Presidente Vargas, em São Luís, Brasil e verificaram que 23,5% eram resistentes ao fluconazol. Todos os isolados de *C. krusei*, *C. famata* e *C. glabrata* foram resistentes ao fluconazol (TERÇAS et al., 2017). Tseng e colaboradores (2018) avaliaram, no período de 2015 a 2018, dados laboratoriais de fungemias envolvendo a *C. guilhermondii* em hospitais de Taiwan e verificaram que apenas 68,00% das espécies de *C. guilhermondii* eram sensíveis ao fluconazol (TSENG et al., 2018).

Quando o cetoconazol foi avaliado, o resultado obtido foi 9,09% de resistência nos isolados de *C. albicans* com valor de CIM de 8 µg/mL e 7,69% de *Candida não-albicans* a *C. tropicalis* e *C. guilhermondii* com CIM de 16 µg/mL. Mahdaviomran e colaboradores (2018) avaliaram 134 isolados de pacientes usuários de prótese dentária e destes apenas 1 isolado de *C. tropicalis* foi resistente ao cetoconazol (MAHDAVI OMRAN et al., 2018). Ito e colaboradores (2004) avaliaram 39 isolados de *Candida* spp. de pacientes com periodontite crônica 3,33% isolados de *C. albicans* e 22,22% de *Candida não-albicans* apresentaram resistência ao cetoconazol com valores de CIM de 8-16 µg/mL (ITO et al., 2004). Shafi; Padmaraj e Mullessery (2015) com 36 pacientes internados com candidíase oral pseudomembranosa no hospital da Faculdade de Medicina de Mangalore, India, verificou 18% de resistência frente ao

cetoconazol, dentre as espécies resistentes *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. lusitaniae* e *C. krusei* (SHAFI; PADMARAJ; MULLESSERY, 2015). Brito e colaboradores (2011) avaliaram 68 isolados clínicos de *Candida* spp. de cavidade oral, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. guilhermondii* e verificaram que todos os isolados foram sensíveis ao cetoconazol com valores de CIM variando entre as 0,03 e 4 µg/mL (BRITO et al., 2011). Verificando-se uma diminuição da suscetibilidade das espécies de *Candida* spp. frente ao cetoconazol nos últimos anos.

A ocorrência de resistência frente aos antifúngicos azólicos itraconazol (LUQUE et al., 2009; MARCOS-ARIAS et al., 2012; SANITÁ et al., 2013), cetoconazol (ITO et al., 2004; MAHDAVI OMRAN et al., 2018; SHAFIEI et al., 2012) e fluconazol (BENITO-CRUZ et al., 2016; TERÇAS et al., 2017; TSENG et al., 2018) tem sido amplamente relatada. A resistência aos antifúngicos azóis é dada por mudanças estruturais codificadas por ERG11 modificando o alvo dos azoles, a superexpressão de ERG11 e o aumento da exocitose do fármaco através de bombas efluxo (JENSEN et al., 2015; VIEIRA; SANTOS, 2017). O papel da superexpressão das bombas de efluxo na resistência a fluconazol parece ser mais proeminente em *C. albicans* (CDR1) e *C. glabrata* (CDR1, CDR2), para *C. tropicalis*, a presença de substituições amino Y132F e S154F em ERG 11 não explica resistência ao fluconazol para a maioria dos isolados (TEO et al., 2019). Além disso, acredita-se que as variações na estrutura dos azóis sejam responsáveis pelos padrões de resistência cruzada observada em *C. glabrata* (KANAFANI; PERFECT, 2010; PFALLER, 2012; PFALLER et al., 2007). No presente estudo os resultados encontrados foram 14 (28,57%) espécies resistentes ao fluconazol e destas 4 (28,57%) foram resistentes apenas a este fármaco, 2 (14,28%) resistentes ao itraconazol, 5 (35,71%) ao itraconazol e fluconazol, 4 (28,57%) aos três azóis e 1 (8,33%) aos 4 antifúngicos testados.

A nistatina tem sido relatada na literatura como amplamente utilizada em infecções fúngicas na cavidade oral (AKPAN; MORGAN, 2002; DANGI; SONI; NAMDEO, 2010; VILA et al., 2020). Avaliando a suscetibilidade da nistatina encontramos no presente estudo um isolado resistente (3,03%) com CIM de 64 µg/mL, 3 (9,09%) sensível dose dependente para a *Candida albicans* e 4 (19,23%) isolados sensível dose dependente para *Candida* não-*albicans*, 2 de *C. lusitaniae*, 1 de *C. tropicalis* e 1 de *C. guilhermondii*, todos com CIM de 16 µg/mL. Jabalameli et al (2017) avaliaram a susceptibilidade das *Candida* spp. isoladas de lesões da cavidade oral de

12 pacientes em quimioterapia num hospital no Iran e verificaram 66,70% de resistência frente a nistatina (JABALAMELI et al., 2017). Em pacientes HIV positivos 61,10% dos isolados de *Candida* spp. da orofaringe foram suscetíveis à nistatina, 36,10% foram suscetível dose dependentes, e 2,80% foram resistentes à nistatina (DAR et al., 2015). Em outro estudo foram encontrados 3,00% de isolados sensível dose dependente com CIM variando de 8-32 µg/mL e 2,00% de resistentes a nistatina pela *Candida* spp. isolada da orofaringe de pacientes infectados pelo HIV com CIM de 64 µg/mL (WINGETER et al., 2007). Brito e colaboradores (2011) avaliaram 59 isolados de *Candida* spp. de pacientes soro positivo e 9 isolados do grupo controle encontrando 98,53% de isolados sensíveis, 1(1,47%) isolado sensível dose dependente para nistatina com valores de CIM variando entre as espécies, 2 µg/mL para *C. albicans* e 2-4 µg/mL para *C. tropicalis* no grupo controle e 1-8 µg/mL para *C. albicans*, 2-4 µg/mL para *C. tropicalis*, 2 µg/mL para *C. glabrata*, 4 µg/mL para *C. guilhermondii* e *C. krusei* no grupo teste (BRITO et al., 2011). Para Nenoff e colaboradores (2016) não observaram evidências de resistência *in vitro* por espécies de *Candida* spp. para a nistatina, apesar do longo período de tempo em que tem sido usado como antifúngico tópico. No entanto, tal trabalho avaliou somente 11 isolados de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol correspondendo a *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. kefyr* (NENOFF et al., 2016). A ocorrência de resistência aos antifúngicos polienicos é menos frequente, pois mutações que levam a esse tipo de resistência diminuem sua tolerância a estresses externos restringindo sua virulência (KANAFANI; PERFECT, 2010; KUMAR; SHUKLA, 2010; VINCENT et al., 2013). Os mecanismos envolvidos no aumento de resistência aos antifúngicos polienicos resultam de alterações na composição da membrana plasmática fúngica, mutação do gene *ERG3*, que leva à formação de esteróis com menor afinidade de ligação ao antifúngico polienico ou um decréscimo na sua produção (JENSEN et al., 2015; VIEIRA F, 2017), a superexpressão de bombas de efluxo (REN et al., 2014). Outros estudos reportam que mutações genéticas em *ERG2*, *ERG5*, *ERG6* e *ERG11* podem afetar a síntese do ergosterol levando à diminuição na sua quantidade ou na síntese de outros esteróis com afinidade reduzida ao fármaco (LOTFALI et al., 2017; VIEIRA F, 2017), como é o caso de *ERG 2* em *C. glabrata* (AHMAD et al., 2019), *ERG6* em *C. glabrata* (AHMAD et al., 2019; VANDEPUTTE et al., 2008) e *C. parapsilosis* (LOTFALI et al., 2017), *ERG5* em *C. albicans* (MARTEL et al., 2010) e

ERG11 em *C. glabrata* (HULL et al., 2012), e *C. tropicalis* (EDDOUZI et al., 2013), O mecanismo do desenvolvimento de resistência a polienios em *C. lusitaniae* não está bem esclarecido, sugere-se que mutações FKS (inibição da síntese de beta 1,3 glucano) poderia induzir o estresse da parede celular, o que poderia resultando em menor suscetibilidade ao fármaco (ASNER et al., 2015).

Todos os isolados testados no presente estudo foram avaliados quanto a sua capacidade de adesão a células epiteliais normais e estão discutidos no manuscrito II. Estudos já descreveram acerca do gênero *Candida* e sua capacidade de aderir firmemente em diferentes superfícies, incluindo células e superfícies abióticas, como dispositivos médicos invasivos, é uma característica importante detectada em leveduras do gênero *Candida* constituindo uma etapa importante no processo infeccioso em humanos (DE MENEZES et al., 2013; NUNES et al., 2019). A literatura descreve uma grande variação nos resultados referentes a capacidade de adesão em espécies do gênero *Candida*.

No manuscrito II, verificamos uma maior capacidade de adesão nos isolados provenientes dos usuários de prótese dentária que no grupo controle. As espécies com maior capacidade de adesão foram *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. glabrata* e *C. intermedia*, no entanto foi observado uma grande diferenciação na capacidade de adesão de *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* e *C. glabrata* entre os isolados da mesma espécie, não sendo possível verificar diferença estatística entre elas. A *C. intermedia* foi isolada em apenas um paciente, não sendo passível de comparação estatística. Apenas 3 (5,08%) dos isolados não apresentaram capacidade de adesão. Dessa forma, nossos resultados corroboram com os resultados já relatados onde *C. tropicalis* (DE MENEZES et al., 2013) e *C. glabrata* (TAMURA et al., 2007) apresentaram boa capacidade de adesão. Não foi encontrado estudo sobre a capacidade de adesão da *C. intermedia* e *C. lusitaniae* em células epiteliais. No entanto, há relatos de casos onde a espécie foi relacionada a fungemias nosocomiais (GARCÍA-AGUDO; RODRÍGUEZ-IGLESIAS; CARRANZA-GONZÁLEZ, 2018; RUAN et al., 2010; SUTCU et al., 2016; TAJ-ALDEEN et al., 2014). Nunes e colaboradores (2019) trabalharam com isolados clínicos de pacientes adultos, com candidíase invasiva coletados em Unidade de Terapia Intensiva da Universidade Federal de Pernambuco e verificaram uma grande variabilidade no perfil de adesão destes isolados onde 41,00% não apresentaram capacidade de adesão e 58,00% possuíam capacidade de se aderir

fraca ou fortemente as células epiteliais humanas, sendo a *C. tropicalis*, a espécie com maior capacidade de adesão (NUNES et al., 2019). Em outro estudo realizado por Menezes et al., (2013) ao analisarem a capacidade de aderência da *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*, isolados clínicos de pacientes internados em hospitais públicos e privados de São Luís, Maranhão, observaram que 79,00% apresentaram propriedade de aderência, onde as cepas de *C. tropicalis* foram as que apresentaram maiores níveis de adesão (DE MENEZES et al., 2013). Tamura et al. (2007) relatam a *C. glabrata* como a espécie com maior capacidade de adesão em relação as outras espécies de *C. não-albicans* (TAMURA et al., 2007), entretanto no estudo de Araújo e colaboradores (2020) 80,00% das espécies de *C. glabrata* não apresentaram perfil de aderência (ARAÚJO et al., 2020). Silva-Dias e colaboradores (2015) avaliaram 230 isolados de *Candida* spp. obtidos de pacientes do Centro Hospitalar São João em Porto, Portugal, sendo que *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* foram as espécies que apresentaram melhor capacidade de adesão e *C. albicans* um perfil de baixa adesão (SILVA-DIAS et al., 2015).

A maior capacidade de adesão a células epiteliais dos isolados provenientes de usuários de próteses dentárias em relação aos pacientes do grupo controle, isto pode estar relacionado com a diminuição salivar nos indivíduos do grupo usuários de próteses dentárias uma vez que este grupo é formado predominantemente por mulheres com idade média superior ao do grupo controle (MUÑOZ et al., 2019; MUTLUAY et al., 2010). Dessa forma verificou-se que o perfil de adesão das espécies avaliadas neste estudo é dependente das condições de crescimento e das características do substrato corroborando com os dados encontrados em trabalhos anteriores (SILVA-DIAS et al., 2015; TEN CATE et al., 2009).

Outro fator relevante no perfil de adesão é a composição da parede celular (SILVA-DIAS et al., 2015). Estudo *in vitro* envolvendo isolados orais de *C. glabrata* e *C. albicans*, em relação à sua hidrofobicidade relativa da superfície celular (CSH) e adesão a superfícies acrílicas, demonstraram uma correlação positiva em *C. glabrata* (LUO; SAMARANAYAKE, 2002). No entanto, é difícil precisar a relação do CSH relativo para a colonização *in vivo*, diante da influência de outros fatores como saliva e a presença de bactérias em superfícies hospedeiras, parâmetro não avaliado neste estudo.

Assim como a adesão, a capacidade de formar biofilmes desempenha um papel importante na patogênese. Os microrganismos formadores de biofilmes são caracterizados pela alta invasividade e sensibilidade reduzida aos antimicrobianos e no aumento da sobrevivência em condições ambientais desfavoráveis (LOHSEA et al., 2020; TARGALSKA; KUNICKA-STYCZYŃSKA, 2017). No manuscrito II todos os isolados foram testados quanto a sua capacidade de formação do biofilme. Dos 39 (66,10%) isolados de *Candida* spp. que possuíam a capacidade em formar biofilme, destes 100,00% dos isolados de *C. lusitaniae*, 6 (75,00%) de *C. tropicalis*, 4 (66,66%) de *C. glabrata* e 12 (61,29%) dos isolados de *C. albicans* foram positivos para a formação de biofilme. Do total de isolados testados para capacidade de formação de biofilme, 8 (21,62%) produziram fortemente, 3 (10,81%) média e 25 (67,56%) fracamente. Estes resultados encontrados apresentaram valores inferiores na literatura (PANNANUSORN; FERNANDEZ; RÖMLING, 2013) onde Pannanusorn, Fernandez e Romling (2013) analisaram 393 isolados clínicos em candidíases invasivas pertencentes ao laboratório de microbiologia clínica na Suécia e verificaram que todos os isolados de *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. krusei* e *C. pelliculosa* formaram biofilme. Essa diferença pode ter sido ocasionada devido a origem dos isolados do presente estudo, todos da mucosa oral, uma vez que em estudos anteriores foi demonstrado que a presença de saliva pode afetar negativamente a formação de biofilme e a adesão celular (JIN et al., 2004; MUTLUAY et al., 2010).

Segundo Pathirana e colaboradores (2019), as espécies de *Candida tropicalis* e *Candida dubliniensis* podem ser isoladas juntamente com *Candida albicans* devido a facilidade da *C. albicans* formar biofilmes em conjunto com outras microbiotas orais, incluindo bactérias e leveduras. A adesão entre espécies é importante para o estabelecimento desses biofilmes mistos. O crescimento e a manutenção de biofilmes mistos são provavelmente facilitados pela adesão entre espécies de células-células (PATHIRANA et al., 2019). A presença de biofilme e o desenvolvimento de resistência durante o tratamento observada em algumas espécies de *Candida* spp. tem dificultado o manejo terapêutico na candidíase oral (GOULART et al., 2018).

Os estudos sobre a capacidade de formação de biofilme de Kumari e colaboradores (2018) e Vieira de Melo e colaboradores (2019) avaliaram diferentes espécies de *Candida* spp. e a *C. tropicalis* foi citada como a espécie com maior capacidade de formação de biofilmes, o que pode ser atribuído, a maior quantidade

de carboidratos matriciais, proteínas, e-DNA e a sua hidrofobicidade da superfície celular (KUMARI et al., 2018; VIEIRA DE MELO et al., 2019). Estes dados diferem do estudo de Sherry e colaboradores (2017) onde avaliaram a capacidade de formação de biofilme da *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* e *C. guilliermondii* em isolados do trato genital feminino e resistentes ao fluconazol sendo que as espécies com maior capacidade de formação de biofilme foram *C. albicans* e *C. glabrata* (SHERRY et al., 2017). No presente estudo verificou-se maior capacidade de formação de biofilme em *Candida* não-*albicans*, $p < 0,05$. Estes dados corroboram com os dados encontrados por Pannanusorme colaboradores (2013) onde as espécies de *Candida* não-*albicans* com maior capacidade de formação de biofilme foram *C. tropicalis* e *C. lusitaniae*. Ainda no presente estudo ficou evidenciada uma grande heterogenicidade na habilidade de formação de biofilme entre as espécies de *Candida* spp., as quais podem estar relacionadas com o ambiente da mucosa oral, o tipo de material utilizado para a fabricação da prótese, o seu tratamento de limpeza e a diversificada microbiota presente neste ambiente. Já é conhecido que a adesão inicial de microrganismos às dentaduras é essencial para a patogenicidade, mas os substratos da prótese são altamente variáveis, o que pode suportar aderência diferencial na formação do biofilme. O Polimetilmetacrilato (PMMA) é classicamente usado como substrato para dentaduras (PARK; PERIATHAMBY; LOZA, 2003). O'Donnell e colaboradores (2017) estudaram a formação de biofilme pela *Candida albicans* em PMMA, polietileno e silicone, em 4 e 24h e verificaram que PMMA é o substrato mais propenso à formação de biofilme nos estágios posteriores do desenvolvimento, independentemente do fenótipo do isolado. Relacionaram este dado a porosidade do material o qual propiciaria que os microrganismos ficassem aderidos a suas fendas e rachaduras. O estudo de Bal, Yavuzylmaz e Yucel (2008) verificaram que a capacidade de aderência da *Candida* spp. em polietilmetacrilato, polisilosixano e polimetilsiloxane, ocorreu com aumento significativo da colonização microbiana após 14 dias, nos materiais mais flexíveis (BAL; YAVUZYILMAZ; YÜCEL, 2008).

Quanto a higienização bucal, a pesquisa de Ramage e colaboradores (2011) demonstra que enxaguantes bucais comercialmente disponíveis como Oraldene®, Listerine® e Cordosyl® tem a capacidade de reduzir em 80,00% a viabilidade do biofilme *in vitro* (RAMAGE et al., 2011). Os enxaguatórios bucais são compostos por

princípios ativos destinados a auxiliar no controle mecânico e na manutenção da saúde bucal. A eficácia das diferentes formulações como hexetidina, povidone-iodeto, gluconato de cloridexidina, óleos essenciais, cloreto de cetilpiridina e peróxido de hidrogênio já foram descritas (RAMAGE et al., 2011; TAKENAKA; OHSUMI; NOIRI, 2019). Os enxaguatórios bucais tem ação anti-placa e anti-gengivite, impedindo a adesão de microrganismos, passo inicial para a formação de biofilmes (TAKENAKA; OHSUMI; NOIRI, 2019). Os componentes ativos em enxaguantes bucais disponíveis comercialmente têm atividade antimicrobiana de amplo espectro por meio da ruptura da membrana que, ao contrário dos azóis e polienos, não está relacionada ao ergosterol da membrana celular do fungo, resistência e toxicidade. Além disso, compostos como o gluconato de clorexidina demonstram substantividade por adsorção em proteínas e material extracelular (RAMAGE et al., 2011). Park e Lee (2018) observaram em isolados clínicos de *C. albicans* forte correlação positiva entre a hidrofobicidade da superfície celular e a formação de biofilme ($r=0,708$; $p < 0,05$) ou da adesão celular ($r=0,509$; $p < 0,05$). Esses resultados sugerem que a força hidrofóbica dos microrganismos pode desempenhar um papel importante na adesão e na formação do biofilme (PARK; LEE, 2018). Segundo observado por Kumari et al. (2018), a *C. krusei* tem apresentado capacidade de adesão reduzida em comparação com a *C. albicans*, no entanto é capaz de formar um biofilme com alto teor matricial. Em contrapartida a *C. albicans* pode expressar diferentes moléculas de adesinas que auxiliam na ligação durante os estágios iniciais da formação dos biofilmes e possui a arquitetura do biofilme mais complexa e heterogênea (KUMARI et al., 2018). No presente estudo, o perfil de adesão dos isolados e sua capacidade de formação do biofilme revelou um coeficiente de correlação (r) 0,7767 com valores de $p < 0,05$ no Teste de Pearson, evidenciando uma correlação forte entre a capacidade de adesão e a capacidade de formação do biofilme.

A adesão celular e a formação de biofilmes estão relacionadas com a resistência aos antifúngicos através da limitação na difusão do agente antimicrobiano pela matriz extracelular, alterações fenotípicas das células no biofilme ou a alteração no seu genótipo (SANTANA et al., 2013; ALMEIDA et al., 2016a; SHANKAR RAUT; MOHAN KARUPPAYIL, 2016), Com o aumento da resistência aos antifúngicos (KATHIRAVAN et al., 2012; MIRANDA-CADENA et al., 2018; GOULART et al., 2018),

os óleos surgem como uma alternativa na prospecção de novos fármacos (EDRIS, 2007; DAGLI et al., 2015; PARENTE-ROCHA et al., 2017).

A utilização de óleos essenciais em formulações para odontologia tem sido relatada como benéfica no controle da formação do biofilme dentário. A atividade antibiofilme pode ser baseada em uma série de mecanismos como a inibição da proliferação do biofilme, interferência na colonização do biofilme e/ou atividade antimicrobiana (FILOGÔNIO et al., 2011a; RAMAGE et al., 2011). A atividade antifúngica dos óleos essenciais de cravo, canela, gerânio e noz-moscada tem sido objeto de vários estudos (DIAS et al., 2018; DOS SANTOS et al., 2020; DŽAMIĆ et al., 2014; MAHBOUBI; MAHDIZADEH; HEIDARYTABAR, 2018) e é discutida no manuscrito III. Estes óleos apresentam grande importância econômica, sendo utilizados na indústria de alimentos e na área de cosméticos.

No manuscrito III, os melhores resultados obtidos foram com os óleos de cravo e canela frente as cepas avaliadas. Dos 19 isolados testados 9 (47,36%) apresentaram valores de CIM de 1000 µg/mL para um ou mais dos óleos essenciais testados, destes 7 (77,77 %) apresentam forte capacidade de formação de biofilme e 5 (55,55 %) maior capacidade de adesão as células epiteliais normais.

O óleo de cravo já apresentou atividade antifúngica para a *Candida* spp., *Aspergillus* spp. e espécies de dermatófitos (PINTO et al., 2009). Quando testado com a *C. albicans* apresentou CIM de 93 a 77 µg/mL (PINTO et al., 2009). Em nosso estudo obtivemos valores de CIM de 500 a 31,25 µg/mL para *Candida* spp. O óleo volátil obtido por hidrodestilação, a partir de botões florais secos é constituído majoritariamente de eugenol, em torno de 85,0% (FARMACOPEIA, 2010), um estudo anterior constatou a ação antifúngica deste com valores de CIM entre 67 a 19 µg/mL para o eugenol, o que condiz com os valores de CIM do óleo quando verificado sua constituição química (PINTO et al., 2009).

A atividade antifúngica do óleo essencial de *C. cassia* (canela) frente a *C. albicans* ATCC 90029 obteve valores de CIM de 500 µg/mL por Giordani et al. (2006). Em outro estudo quando avaliado frente a *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei* apresentou CIM de 138, 225, 450 e 110 µg/mL respectivamente (OOI et al., 2006), e CIM de 62,5 µg/mL para a *C. glabrata* resistente ao fluconazol (ALMEIDA et al., 2017). Estes dados corroboram com os resultados do presente estudo onde valores obtidos de CIM foram de 500 a 31,25 µg/mL para *C. albicans*, de 250 a 15,62

$\mu\text{g/mL}$ para *C. tropicalis*, de 500 a 62,5 $\mu\text{g/mL}$ para *C. glabrata* e 500 $\mu\text{g/mL}$ para *C. krusei*. O óleo essencial de *Cinnamomum cassia* L. pode ser extraído de folhas ou ramos jovens e é constituído predominantemente por trans-cinamaldeído e possui um rendimento mínimo de 1% (FARMACOPEIA, 2010).

A atividade antifúngica do óleo essencial de gerânio foi avaliada frente as cepas de *C. albicans* apresentando um CIM de 250 $\mu\text{g/mL}$ (DŽAMIĆ et al., 2014), e frente a *Candida* spp.. Em pesquisa desenvolvida por Essid e colaboradores (2017) obtiveram resultados de CIM entre 500 e 250 $\mu\text{g/mL}$ para 10 dos 11 isolados estudados de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. riferii* e um CIM de 1000 $\mu\text{g/mL}$ para uma cepa de *C. albicans* e CIM de 256 a 128 $\mu\text{g/mL}$. Estudos prévios pelo nosso grupo de pesquisa onde foram analisados óleos provenientes de diferentes regiões frente a *Candida* spp. (DOS SANTOS et al., 2020), corroboram com os resultados obtidos no presente estudo, onde obtivemos a CIM entre 1000 a 125 $\mu\text{g/mL}$ frente a *C. albicans*. O óleo de gerânio obtido através de hidrodestilação das partes aéreas da planta apresenta um rendimento de 1 a 1,3 % (BLANK et al., 2012) e seus principais constituintes são o geraniol, citronelol e linalol (MAHBOUBI; MAHDIZADEH; HEIDARYTABAR, 2018; MOUTAOUAFIQ et al., 2019). Estudos recentes atribuem sua atividade antifúngica ao geraniol, citronelol (MAHBOUBI; MAHDIZADEH; HEIDARYTABAR, 2018) e linalol (DIAS et al., 2018).

O óleo essencial de *Myristica fragrans* Houtt na concentração de 0,1% inibiu o crescimento de *Fusarium oxysporum*, *F. semitectum*, *Aspergillus niger* e *A. Glaucus* (VALENTE et al., 2011). Em outro estudo o óleo essencial de noz-moscada proveniente das Ilhas de Andamão, Índia, quando foi testado por Pal. Mahesh e colaboradores (2011) frente a *C. albicans* não demonstrou atividade pela técnica de suscetibilidade Kirby-Bauer (PAL. MAHESH et al., 2011). Estes dados diferem dos resultados do presente estudo onde verificou-se atividade antifúngica em todos os isolados testados com CIM compreendido entre 1000 e 31,25 $\mu\text{g/mL}$ e 47,36% de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Isso pode ser explicado pelos diferentes níveis de miristicina e elemicina dos dois óleos. Esta composição química divergente poderia ser o resultado de vários parâmetros como estágio de desenvolvimento da planta, origem geográfica, condições de armazenamento, temperatura, nutrição entre outros (CHATZOPOULOU; KATSIOTIS, 1995).

O mecanismo de ação dos óleos essenciais tem sido investigado em vários estudos (ESSID et al., 2017a; MIRON et al., 2014; NAZZARO et al., 2017). A natureza lipofílica dos componentes terpenóides pode provocar rupturas nas membranas das células fúngicas levando à morte das mesmas (NAZZARO et al., 2017), a ligação dos monoterpenos ao ergosterol ocasionando a desestabilização das membranas celulares dos fungos (MIRON et al., 2014), pela inibição da biossíntese do ergosterol (ESSID et al., 2017a) bloqueando o crescimento de leveduras como *Candida albicans*, através da inibição do seu crescimento na fase S do ciclo celular, atuando na via de sinalização da morfogênese das pseudo hifas ou impedindo a formação de biofilmes resistentes aos fármacos utilizados no tratamento de infecções causadas por espécies de *Candida* spp. (AGARWAL; LAL; PRUTHI, 2008). Em estudo realizado por Gucwa e colaboradores (2018), os autores analisaram os óleos de canela frente a *C. albicans* e *C. glabrata* evidenciando a atividade fungicida do óleo nas concentrações de CIM e ½ CIM após 6h de incubação, corroborando com os resultados encontrados no presente estudo, no qual foi verificada uma diminuição no crescimento de *C. albicans* de (92,08; 79,16%) em 3h e (99,95%; 99,95%) em 6h de incubação e para *C. glabrata* (98,50%; 96,16%) em 3h quando utilizado as concentrações de CIM e ½ CIM do óleo essencial de canela (GUCWA et al., 2018b).

Um estudo de ESSID e colaboradores (2017) verificaram a curva de sobrevivência de da *C. albicans* ATCC 10231 quando submetida a diferentes concentrações dos óleos essenciais de *C. verum* e *P. graveolens* e do antifúngico fluconazol. Os autores verificaram atividade candidicida dependente da dose para os dois óleos essenciais e ao fluconazol. O OE Ge demonstrou atividade fungicida (97,44%) no valor de CIM e uma redução de 63,00% quando testado em concentrações sub-inibitórias (½ CIM) no crescimento após 3 h de incubação. O fluconazol, por sua vez, demonstrou atividade fungistática contra a cepa de *C. albicans* e inibiu 66,70% do crescimento da mesma na CIM após 3 h de incubação (ESSID et al., 2017b). Os resultados obtidos no presente estudo (manuscrito III) corroboram com o trabalho de ESSID e colaboradores para o OE Ge, efeito fungicida nas concentrações de CIM e ½ CIM, após 6h de incubação apresentando uma diminuição na concentração de 99,99% e 99,95% respectivamente.

Uma abordagem alternativa para superar a resistência aos antifúngicos poderá ser o uso de produtos naturais e fitoquímicos. Estudos tem demonstrado que óleos

essenciais podem inibir a formação de biofilme por espécies de *Candida* (LOU et al., 2017; PEIXOTO et al., 2017; SAHARKHIZ et al., 2012; VIVIANA et al., 2019). Tema abordado no manuscrito IV - Antibiofilm activity of the essential oil of *Pelargonium graveolens* L'Her, *Cinnamomum cassia* L., *Syzygium aromaticum* L. Mr. Merr. & L.M. Perry and *Myristica fragrans* Houtt in clinical isolates of *Candida* spp.

No manuscrito IV, verificou-se uma redução na capacidade de formação de biofilme acima de 90% para *C. dubliniensis* para todos os óleos testados. A atividade antibiofilme de óleos essenciais está baseada na inibição da proliferação do biofilme, interferência na sua colonização ou por sua atividade antimicrobiana (FILOGÔNIO et al., 2011; NETT; ANDES, 2020). Quando testada a atividade antibiofilme dos óleos essenciais nas concentrações de 0,25 CIM, 0,5 CIM e 1 CIM frente a *C. dubliniensis* ATCC MYA verificou-se a uma maior redução nas concentrações de 0,5 e 1 CIM nos quatro óleos testados. No entanto, observa-se uma redução significativa do crescimento fúngico nestas concentrações (0,5 e 1 CIM), sugerindo que a atividade antibiofilme nestas concentrações se deve basicamente pelo controle do crescimento fúngico. Assim, a redução na capacidade de formação do biofilme a 0,25 CIM (crescimento fúngico detectado) sugere que os óleos essenciais estudados podem interferir na proliferação do biofilme ou interferir na sua colonização, reforçando a sua utilização na prospecção de novos agentes antifúngicos.

Rajkowska; Nowicka-Krawczyk e Kunica-Styczynska (2019) observaram também a capacidade de formação do biofilme em diferentes espécies de *Candida* spp. na presença de óleo essencial de cravo em vidro, tereftalato de polietileno e polipropileno verificando uma redução na capacidade de formação do biofilme em 68,40–84,20% dependendo do material testado (RAJKOWSKA; NOWICKA-KRAWCZYK; KUNICKA-STYCZYNSKA, 2019). Neste estudo, observou-se a redução de 28,36% a 58,34% na concentração de 0,25 CIM para as espécies de *C. albicans* e *C. lusitaniae* e 5,98 a 35,66 para *C. tropicalis*. Em outro estudo Rajkowska (2019) e colaboradores verificaram que em concentrações subinibitórias (0,5 CIM) o óleo essencial de cravo pode promover alterações no morfotipo das colônias de *C. albicans* o que poderia afetar as interações intra espécies e com isso a formação de biofilme (RAJKOWSKA; NOWICKA-KRAWCZYK; KUNICKA-STYCZYNSKA, 2019).

O óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* inibiu de 39,94 a 49,42% a formação de biofilme em diferentes espécies de *Candida* na concentração de 500

$\mu\text{g/mL}$ e foi capaz de erradicar 50,00% do biofilme maduro (em 24 h e 48 h) para a maioria das espécies testadas, exceto para *C. tropicalis* onde a diminuição foi de 33,00% (DE LUCENA RANGEL et al., 2018). Em outro estudo, Firmino e colaboradores (2018) os óleos de *Cinnamomum zeylanicum* e *Cinnamomum cassia* e E-cinamaldeído inibiram a formação de biomassa do biofilme em 100,00% quando comparados com o crescimento normal de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* em concentrações entre 60 e 500 $\mu\text{g/mL}$. Neste mesmo estudo foi verificado que a concentração de E-cinamaldeído necessária para reduzir o biofilme de *Streptococcus pyogenes* foi de aproximadamente oito vezes maior que a encontrada no óleo de *Cinnamomum cassia* e quatro vezes maior que a *Cinnamomum zeylanicum* sugerindo que outros componentes dos óleos essenciais também participam sinergicamente na ação antibiofilme (FIRMINO et al., 2018). No estudo de Kim e colaboradores (2015) foi verificado que o óleo de *Cinnamomum cassia* e o cinamaldeído são capazes de inibir a formação de biofilme de *P. aeruginosa* (KIM et al., 2015). E o óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* tem a capacidade de erradicar o biofilme maduro de *C. albicans* (ESSID et al., 2019). No presente estudo, verificamos uma inibição de 17,03 a 62,53% frente a *C. lusitaniae* e *C. albicans*, estando de acordo com os estudos anteriores de *C. cassia* e *Cinnamomum zeylanicum* frente a *Candida* spp. (DE LUCENA RANGEL et al., 2018; FIRMINO et al., 2018). No entanto, a redução da atividade antibiofilme foi inferior a 10% frente a *C. tropicalis*, corroborando com estudos anteriores onde foi verificado diminuída atividade antibiofilme de óleos essenciais frente a mesma espécie (DE LUCENA RANGEL et al., 2018; ZOMORODIAN et al., 2018).

O óleo essencial de *Pelargonium graveolens* (OE Ge), geraniol e linalol, seus maiores constituintes, foram capazes de inibir 50,00% da formação de biofilme em *C. tropicalis* em 24h nas concentrações de 4000 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$ e 1000 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (SOUZA et al., 2016). No presente estudo verificou-se a inibição de 20,32 a 56,36% na produção de biofilme em *C. albicans* e *C. lusitaniae* e de 1,65 a 15,32% para *C. tropicalis* na concentração de 0,25 CIM para o OE Ge, estando de acordo com estudos anteriores (SOUZA et al., 2016). A atividade antibiofilme deste óleo se deve a seus constituintes eugenol, linalol e geraniol (KANNAPPAN et al., 2019; SOUZA et al., 2016).

Para o óleo essencial de *Myristica fragrans* (OE Nz) cujos principais constituintes são miristicina, sabineno, elimicina e terpin-4-ol, não foram encontrados dados referentes a atividade antibiofilme do óleo essencial de noz moscada, no entanto estudo envolvendo óleos essenciais contendo eugenol nas concentrações em 0,01%, reduziram a densidade celular final em cerca de 20,00% (KIM et al., 2016). No presente estudo obteve-se uma redução de 14,37 a 64,10% para *C. albicans* e *C. lusitaniae* com a utilização da adição do OE Nz na concentração de 0,25 CIM. A atividade antibiofilme do óleo de noz-moscada se deve ao eugenol, sabineno e terpin-4-ol (LAGHA et al., 2019; PARENTE-ROCHA et al., 2017; MARENGO et al., 2018).

A atividade antibiofilme pode estar relacionada à presença dos constituintes como o eugenol (óleo de cravo e noz moscada), geraniol (óleo de gerânio), sabineno (óleo de noz-moscada) e cinamaldeído (óleo de canela) (JAFRI; KHAN; AHMAD, 2019; KHAN; AHMAD, 2012; LAGHA et al., 2019; LIRA et al., 2020b), identificados no presente estudo. Manoharan e Lee (2017) verificaram que a presença de cânfora e do álcool fenchílico inibem a formação de hifas, desestruturando a produção de matriz no biofilme de *C. albicans* (MANOHARAN; LEE; LEE, 2017). Jafri; Khan e Ahmad (2019) avaliou a atividade do eugenol sobre biofilmes únicos e mistos de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* por microscopia eletrônica de varredura e verificou que o mesmo é capaz de ocasionar ruptura da membrana celular e desestruturar a matriz dos biofilmes (JAFRI; KHAN; AHMAD, 2019). O geraniol demonstrou atividade antibiofilme interferindo na formação dos biofilmes de *Staphylococcus aureus* e *S. Epidermidis* (LIRA et al., 2020b). Dalleau e colaboradores (2008) verificaram a capacidade que o cavacrol foi capaz de erradicar 75% do biofilme maduro de *C. albicans* (DALLEAU et al., 2008). E o cinamaldeído está parcialmente relacionado com o *down regulation* do *quorum sensing* (KIM et al., 2015). Estas informações são de grande relevância para o estudo de interações farmacológicas. O uso concomitante de duas substâncias com mecanismos de ação distintos pode atuar de maneira sinérgica ou aditiva, promovendo um ganho na eficiência (GAVARIC et al., 2015). Estudos recentes têm demonstrado que se pode obter um aumento da atividade antifúngica e redução na formação de biofilme de óleos essenciais quando utilizado em associação com outras substâncias (JAFRI et al., 2019; KHAN; AHMAD et al., 2012; LIRA et al., 2020). Foram relatadas a atividade sinérgica *in vitro* em combinações de óleos essenciais com antimicrobianos (ROSATO et al., 2018),

fitoconstituintes e antifúngicos, entre dois fitoconstituintes (CARDOSO et al., 2016; XU et al., 2019) e na associação de mesmo poliméricos bioadesivos em formulações, tais como a quitosana (LARA et al., 2018).

A atividade antimicrobiana da quitosana frente a *C. albicans* vem sendo objeto de estudo nos últimos anos (BALICKA-RAMISZ et al., 2005; NAMANGKALAKUL et al., 2020; PEÑA; SÁNCHEZ; CALAHORRA, 2013; SEYFARTH et al., 2008; SHIH et al., 2019). O estudo de Balicka-Ramisz e colaboradores (2005) avaliaram a concentração inibitória mínima de quitosana frente a vários microrganismos e obtiveram CIM entre 700 e 2000 µg/mL para as bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella paratyphi*, 600 µg/mL para *Candida albicans* e 1-2,2 µg/mL para os dermatófitos *Trichophyton mentagrophytes* e *Microsporum canis* (BALICKA-RAMISZ et al., 2005). Namangkalakul e colaboradores avaliaram a atividade da quitosana de diferentes pesos moleculares frente a *Candida* spp. da mucosa oral e verificaram que a quitosana solúvel em água e de alto peso molecular pode inibir a aderência da *C. albicans* em próteses dentárias (NAMANGKALAKUL et al., 2020), o primeiro passo na produção de biofilme. Algumas formulações vem sendo desenvolvidas na indústria farmacêutica e de alimentos com a finalidade de obter efeito sinérgico ou aditivo na utilização de quitosana e óleos essenciais para o controle do crescimento fúngico (DOS SANTOS et al., 2020; HASHEMINEJAD; KHODAIYAN; SAFARI, 2019; SHAO et al., 2015).

Seyfarth e colaboradores (2008) analisaram a atividade antifúngica do cloridrato de quitosana de baixo peso molecular e alto peso molecular, carboximetil quitosana e oligossacarídeo de quitosana frente a *C. albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata*, verificaram o efeito antifúngico do cloridrato de quitosana de baixo e alto peso molecular contra as espécies estudadas, sendo que a *C. albicans* e *C. krusei* foram as espécies mais sensíveis. A carboximetil quitosana, o oligossacarídeo de quitosana apresentaram apenas uma atividade antifúngica fraca (SEYFARTH et al., 2008). Nossos resultados, mostraram CIM de 500 a 62,5 µg/mL para quitosana Fagron® frente a espécies de *Candida* spp. corroborando com os resultados de estudos anteriores (BALICKA-RAMISZ et al., 2005; NAMANGKALAKUL et al., 2020; PEÑA; SÁNCHEZ; CALAHORRA, 2013; SEYFARTH et al., 2008; SHIH et al., 2019). A adição de 0,5 CIM de quitosana ao meio TSB proporcionou uma redução na formação de biofilme de 30% quando associado ao óleo essencial de cravo, 48% para OE Ca, 52%

para o OE Nz e 64% para OE Ge, quando comparados com o óleo essencial separadamente. Isto sugere um efeito sinérgico ou aditivo da quitosana e os óleos essenciais frente as espécies de *Candida*.

Mendanha e colaboradores (2013) verificaram que os monoterpenos como nerolidol e cineol são capazes de alterar a fluidez da membrana celular dos eritrócitos e fibroblastos, levando a um aumento nas trocas celulares e em altas concentrações, os terpenos podem causar extração lipídica e vazamento do conteúdo citoplasmático (MENDANHA et al., 2013; MENDANHA; ALONSO, 2015). Para avaliar potenciais efeitos tóxicos dos óleos essenciais utilizados no presente estudo foi realizado o teste da atividade hemolítica em eritrócitos humanos e considerado os valores de referência recomendados por Hartmann, Jenkis e Arnold (1970) como sendo recomendáveis valores inferiores a 5,00%. Os resultados obtidos demonstraram que o OE Cr e OE Ca apresentaram atividade hemolítica de (66,49 ± 6,32%) e (8,67 ± 5,89%) respectivamente na concentração de 1000 µg/ mL, e não apresentaram atividade hemolítica de ≤ 500 µg/mL (p<0,05). O OE Ge (65,69 ± 5,48%) na concentração de 1000 µg/mL e (21,42 ± 3,79%) para 500 µg/mL o OE Nz e o antifúngico nistatina em 1000 µg/mL (87,29 ± 6,49%; 76,78 ± 6,72%) em 500 µg/mL (83,85 ± 4,75%; 57,46 ± 3,59%) em 250 µg/mL (28,03 ± 2,34%; 24,64 ± 4,18%) e 125 µg/mL (13,04 ± 2,81%; 18,74 ± 3,37%). Nas demais concentrações não houve atividade hemolítica e não ocorreu diferença estatística entre elas (p<0,05), dessa forma o óleo de geranio utilizado em concentrações de 250 µg/mL ou inferior não está associado ao risco a saúde. O óleo de noz-moscada, assim como a nistatina não apresentaram citotoxicidade em concentrações de 62,5 µg/mL ou inferiores.

Marya e colaboradores (2012) verificaram atividade hemolítica do óleo de cravo em concentrações superiores a 250 µg/mL, no entanto no estudo de Ni; mahdavi e Ghezi (2019) não foi observado atividade hemolítica até a concentração de 2500µg/mL (MARYA et al., 2012; NI; MAHDAVI; GHEZI, 2019). Prashar e colaboradores (2006) avaliaram o óleo de cravo o qual demonstrou ser tóxico numa concentração de 0,03% v/v, lisando 73,00% das células endoteliais. A atividade citotóxica do óleo de cravo pode ser atribuída ao eugenol, seu constituinte majoritário, responsável pela lise de mais 90,00% em uma concentração 0,024% v/v (PRASHAR; LOCKE; EVANS, 2006). Os resultados do presente estudo demonstram que o OE Cr

apresentou atividade hemolítica de (66,49 ± 6,32%) na concentração de 1000 µg/mL, e não apresentou atividade hemolítica em ≤ 500 µg/mL (p < 0,05).

Para as espécies de *Cinnamomum* sp. os dados encontrados na literatura mostram baixa atividade hemolítica. *Cinnamomum tamala* não apresentou atividade hemolítica (DANDAPAT; KUMAR; SINHA, 2014) e o óleo essencial de *C. verum* apresentou 72,90% de hemólise na concentração de 1000 µg/mL, entretanto em baixas concentrações não apresentou atividade hemolítica (ESSID et al., 2019). O óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* tem demonstrado baixa atividade hemolítica de 1 a 4 % em concentrações crescentes do óleo até a concentração máxima de 200 µg/mL (BARROS et al., 2016). Em outro experimento o óleo de *Cinnamomum zeylanicum* apresentou atividade hemolítica menor que 2% em concentrações crescentes até 1000 µg/mL (DE LUCENA RANGEL et al., 2018). No presente estudo, o OE Ca apresentou atividade hemolítica de (8,67 ± 5,89%) na concentração de 1000 µg/mL, e não apresentou atividade hemolítica em concentração ≤ 500 µg/mL (p < 0,05). Considerando que os resultados obtidos de CIM estão na faixa de 500 a 15,62 µg/mL para o óleo essencial de canela frente as cepas avaliadas, as concentrações de uso não apresentam atividade hemolítica.

O óleo essencial de *Pelargonium graveolens* (OE Ge) tem demonstrado forte atividade hemolítica, 97,00% no valor de 500 µg/mL (ERNST; ROGERS, 2005), e em outro estudo 97,82% para 500 e 71,47% para 250 µg/mL (ESSID et al., 2017b). No presente estudo o OE Ge apresentou atividade hemolítica de (65,69 ± 5,48%) na concentração de 1000 µg/mL e (21,42 ± 5,79%) para 500 µg/mL e não houve atividade hemolítica nas demais concentrações. As diferenças encontradas nestes testes podem estar relacionadas a composição química do óleo (% de eugenol), uma vez que este constituinte apresenta potencial citotoxicidade (PRASHAR et al., 2006). Para o óleo essencial de noz moscada (OE Nz), cujos principais componentes são miristicina, elimicina, sabineno e terpin-4-ol, não foram encontrados estudos sobre a atividade hemolítica. No entanto sabe-se que o mesmo apresentou um efeito citotóxico baixo IC₅₀ de 24,86 µg/mL no estudo de citotoxicidade *in vitro* na linhagem celular Vero pelo método do MTT (PILLAI et al., 2012).

No presente estudo, os óleos essenciais de *Cinnamomum cassia* L., *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry não apresentaram atividade hemolítica na concentração inibitória mínima. No entanto, ambos os óleos de gerânio e noz-moscada

apresentaram atividade hemolítica na CIM. Esses óleos em concentrações subinibitórias 0,5 CIM e 0,25 CIM podem ser utilizados tanto no controle do crescimento fúngico como para reduzir a formação de biofilme.

Quanto a identificação dos isolados, os meios cromogênicos possui fácil identificação, diferenciando espécies de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*. No entanto, diferentes tons de verde e rosa das colônias podem indicar a mesma espécie ou não. Isso suporta a necessidade de diferentes métodos de diagnóstico, como bioquímica ou espectrometria de massa (GARZA-GONZÁLEZ et al., 2020; KHADKA et al., 2017; PATEL; MODI; SUMAN, 2016; STEFANIUK et al., 2016).

Como alternativa a identificação bioquímica e molecular vem sendo utilizada a espectrometria de massa através de ionização por dessorção à laser assistida por matriz e detecção em analisador do tipo tempo de voo (MALDI-TOF MS) para a identificação rotineira de microrganismos nos centros clínicos em várias partes do mundo (ANGELETTI, 2017; CEBALLOS-GARZON et al., 2020; PANDA et al., 2015), manuscrito V. Esta técnica fornece uma identificação microbiana através da comparação dos perfis de espectros de suas proteínas citoplasmáticas (CEBALLOS-GARZON et al., 2020; PANDA et al., 2015). Esta técnica apresenta algumas limitações na determinação de colônias pequenas ou mucóides, na identificação de espécies intimamente relacionadas e em colônias mistas (PATEL, 2019), o que pode ser minimizada pelo treinamento refinado do operador. Uma criteriosa avaliação do perfil de espectros de cada microorganismo pode ajudar na avaliação crítica da impressão digital-MS, auxiliando o analista na tomada de decisão e expansão da biblioteca de referência.

A identificação e avaliação do perfil de espectros pode ser obtida com auxílio de técnicas de análise multivariada. A análise de componentes principais (PCA), é uma ferramenta estatística de análise multivariada, a qual permite compilar uma grande base de dados destacando os parâmetros mais relevantes para o estudo. É realizada pela projeção dos dados multivariados em um espaço de dimensão menor, reduzindo o número de dimensões sem perda de informações (CHENG et al., 2013).

No manuscrito V, na análise das impressões digitais de MALDI-TOF MS de diferentes isolados clínicos de *Candida* verificou-se um perfil espectral consistente entre as espécies. A maioria dos sinais de proteínas ribossômicas estão

compreendidos entre 3 e 15 kDa e os sinais com maior intensidade estão compreendidos entre 3 e 8 kDa e os de menor intensidade entre 8 e 15 kDa. Resultados semelhantes foram relatados em estudos anteriores (PANDA et al., 2015; PAUL et al., 2018). Através da análise multivariada, observou a presença de sinais característicos de espécies como 4,3 – 4,4 e 5,1 - 5,2 KDa para *C. albicans*, 6,0 - 6,1 KDa para *C. lusitaniae* e 11-11,1 para *C. glabrata*. Nossos dados vêm corroborar com o estudo anterior de (SANTOS, et al., 2011).

Embora outros autores discutam a presença de sinais capazes de identificar perfil de resistência (DELAVY et al., 2019; PAUL et al., 2018) e capacidade de produção de biofilme (DE CAROLIS et al., 2019) através de MALDI-TOF MS, estes dados não são informados.

Apesar do MALDI-TOF MS ser considerado uma importante ferramenta no diagnóstico de infecções fúngicas e do seu grande potencial de utilização na pesquisa científica no que tange resistência fúngica e produção de biofilmes este assunto ainda é pouco explorado. Uma pesquisa nas bases de dados Scielo e Pubmed em setembro de 2020 resultou em 244 artigos, destes, a grande maioria abordam a aplicabilidade do MALDI-TOF na identificação fúngica e apenas 5 artigos estão relacionados a identificação de *Candida* spp. por MALDI-TOF MS e seu perfil de impressão digital MS.

Com base nos resultados da presente pesquisa, pôde-se verificar:

- A prevalência de *Candida* spp. em pacientes usuários de prótese dentária atendidos na Faculdade de Odontologia da UFRGS foi menor que a encontrada na maioria dos dados da literatura, evidenciando a importância da revisão constante para manutenção e substituição das próteses dentárias. A colonização de *Candida* spp. está associada a idade, *diabetes mellitus* e uso de prótese dentárias.
- Menor suscetibilidade aos antifúngicos azólicos em relação a nistatina foi observada nos isolados clínicos testados, sendo este o fármaco mais eficiente no manejo das infecções por *Candida* spp.. Comparando o perfil de susceptibilidade destes isolados com os descritos em estudos semelhantes na última década, percebe-se uma diminuição da suscetibilidade aos antifúngicos ao longo dos anos. Isto reforça a importância de conduzir este tipo de estudo. A determinação da suscetibilidade antifúngica e sua vigilância podem ser úteis na escolha de abordagens terapêuticas ideais para os pacientes usuários de próteses dentárias. Podendo estes resultados serem extrapolados, apoiando a tomada de decisão no tratamento da candidíase.
- Grande heterogeneidade quanto ao perfil de adesão intra espécie no isolados clínicos testados, não sendo possível verificar diferença quanto as propriedades adesivas entre as espécies de *Candida*, apenas a influência das condições de crescimento e das características do substrato. Maior capacidade de formação nos isolados provenientes do grupo de usuários de próteses dentárias e de *Candida não-albicans*. A caracterização destes isolados quanto a adesão e formação de biofilmes podem auxiliar no desenvolvimento de produtos Odontológicos específicos para o controle da candidíase, através da adição de constituintes que controlem e reduzam esses fatores de virulência.
- Os quatro óleos avaliados apresentaram atividade fungicida e antibiofilme frente aos isolados clínicos de *Candida* spp., mesmo em isolados resistentes aos antifúngicos azólicos. Os melhores resultados foram obtidos com os óleos essenciais de *Cinnamomum cassia* L. e *Syzygium aromaticum* L. Merr. & L.M. Perry. Os OEs analisados possuem rendimentos de extração de 1 a 14%, sendo um recurso viável e renovável. O óleo de cravo se encontra na lista

Generally Recognized as Safe (GRAS) do *Food and Drug Administration* (FDA) sob o número PB 238792 e a noz moscada sob número PB266878.

- Os óleos essenciais de *Cinnamomum cassia* L., *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry não apresentaram atividade hemolítica na concentração inibitória mínima. Os óleos de gerânio e noz-moscada apresentaram atividade hemolítica na CIM, no entanto, podem ser utilizados em concentrações subinibitórias 0,5 CIM e 0,25 CIM podem no controle do crescimento fúngico e redução da formação de biofilme.
- O meio cromogênico permitiu o crescimento e o isolamento das leveduras de maior relevância clínica bem como a identificação de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. Krusei*. E não permitiu a discriminação das espécies de *C. guilhermondii*, *C. lusitaniae* e *C. intermedia*. Apesar disto, o meio cromogênico é adequado para o isolamento primário e identificação presuntiva de *Candida* spp, apresentando uma boa correlação quando comparado com o MALDI-TOF.
- A análise das impressões digitais de MALDI-TOF MS em diferentes isolados clínicos de *Candida* verificou-se um perfil espectral consistente entre as espécies. A maioria dos sinais de proteínas ribossômicas estão compreendidos entre 3 e 15 kDa e a presença de sinais característicos das espécies como 4,3-4,4 e 5,1-5,2 KDa para *C. albicans*, 6,0-6,1 KDa para *C. lusitaniae* e 11,0-11,1 KDa para *C. glabrata*. A determinação do perfil espectral pode auxiliar o analista na análise crítica do resultado obtido bem como na ampliação da biblioteca de referência.

Sendo assim, este trabalho espera ter contribuído com o estudo do perfil de suscetibilidade de isolados clínicos de *Candida* spp. provenientes de usuários de próteses dentárias bem como a caracterização destes isolados quanto a capacidade de adesão e formação de biofilme. Bem como, na prospecção de novos agentes terapêuticos para o tratamento da candidíase.

Como direcionamento de estudos futuros este trabalho verificou a atividade antifúngica e antibiofilme dos óleos essenciais de *Pelargonium graveolens* L'Her, *Cinammomum cassia* L., *Syzygium aromaticum* (L.) Merr & Perry e *Myristica fragrans* Hoult obtendo resultados promissores frente a *Candida* spp.. No entanto não fez parte do escopo deste trabalho estudos sobre a capacidade de erradicação dos biofilmes

maduros destes óleos essenciais e a capacidade antibiofilme de seus fitoconstituintes (eugenol, geraniol, cinamaldeido, terpineol, etc...) podendo ser alvo de estudos futuros. Assim como o estudo destes óleos essenciais frente a outros fungos resistentes aos antifúngicos clássicos.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4. ed. Carol Stream, Ill.: Allured Pub. Corp., 2007. viii, 804

ABOUHOSSEINI TABARI, M. et al. Anxiolytic and antidepressant activities of *Pelargonium roseum* essential oil on Swiss albino mice: Possible involvement of serotonergic transmission. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 6, p. 1014–1022, 2018.

ABU-ELTEEN, K. H.; HAMAD, M. A.; SALAH, S. A. Prevalence of oral *Candida* infections in diabetic patients. **Bahrain Medical Bulletin**, v. 28, n. 1, 2006.

ABOUHOSSEINI TABARI, M. et al. Anxiolytic and antidepressant activities of *Pelargonium roseum* essential oil on Swiss albino mice: Possible involvement of serotonergic transmission. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 6, p. 1014–1022, 2018.

ABU-ELTEEN, K. H.; HAMAD, M. A.; SALAH, S. A. Prevalence of oral *Candida* infections in diabetic patients. **Bahrain Medical Bulletin**, v. 28, n. 1, 2006.

ADORJAN, B.; BUCHBAUER, G. Biological properties of essential oils: An updated review. **Flavour and Fragrance Journal**, 2010.

AGARWAL, V.; LAL, P.; PRUTHI, V. Prevention of *Candida albicans* biofilm by plant oils. **Mycopathologia**, v. 165, n. 1, p. 13–19, 2008.

AHMAD, S. et al. ERG6 and ERG2 are major targets conferring reduced susceptibility to amphotericin b in clinical *Candida glabrata* isolates in Kuwait. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 2, p. e01900-18, 2019.

AKPAN, A.; MORGAN, R. Oral candidiasis. **Postgraduate medical journal**, v. 78, n. 922, p. 455–459, 2002.

AL-AHMAD, A. et al. Prevalence of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* in caries-free and caries-active children in relation to the oral microbiota—a clinical study. **Clinical Oral Investigations**, v. 20, n. 8, p. 1963–1971, 2016.

AL-MALAHMEH, A. J. et al. Physiologically based kinetic modeling of the bioactivation of myristicin. **Archives of Toxicology**, v. 91, n. 1, p. 713–734, 2017.

AL-SHAMAHY, H. A. Oral *Candida albicans* Colonization in Dental Prosthesis Patients and Individuals with Natural Teeth, Sana'a City, Yemen. **Biomedical Journal of Scientific & Technical Research**, v. 11, n. 2, p. 1–5, 2018.

AL-SHAMIDAY, A.; AL-MAMOORI, F. Anti-Diabetic Activity of *Cinnamom* A Review. **International Research Journal of Pharmacy and Medical Sciences**, v. 1, n. 5, p. 43–45, 2018.

ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. et al. Susceptibility Test for Fungi: Clinical and Laboratorial Correlations in Medical Mycology. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 57, n. Suppl 19, p. 57–64, 2015.

ALI, B. et al. **Essential oils used in aromatherapy: A systemic review** **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 2015.

ALMEIDA, L. DE F. D. DE et al. Efficacy of citronella and cinnamon essential oils on *Candida albicans* biofilms. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 74, n. 5, p. 393–398, 2016.

ALMEIDA, L. D. F. D. et al. Atividade inibitória de óleos essenciais vegetais frente a *Candida glabrata* resistente a fluconazol. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 21, n. 2, p. 131–138, 2017.

APARNA, M. S.; YADAV, S. Biofilms: Microbes and disease. **Brazilian Journal of**

Infectious Diseases, v. 12, n. 6, p. 526–530, 2008.

ARASTEHFAR, A. et al. Antifungal susceptibility, genotyping, resistance mechanism, and clinical profile of *Candida tropicalis* blood isolates. **Medical mycology**, v. 58, n. 6, p. 766–773, 2020.

ARAÚJO, R. B. DE et al. Virulência e perfil de suscetibilidade antifúngica de espécies de *Candida*. In: **Tópicos Multidisciplinares em Ciências Biológicas**. [s.l.: s.n.]. p. 80–86.

ASBAHANI, A. EL et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, n. 1–2, p. 220–243, 2015.

ASLANI, N. et al. Identification of uncommon oral yeasts from cancer patients by MALDI-TOF mass spectrometry. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, 2018.

ASNER, S. A. et al. Acquired multidrug antifungal resistance in *Candida lusitanae* during therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 90, n. 12, p. 7715–7723, 2015.

AZEVEDO, V. V. C. et al. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2–3, n. 1, p. 27–34, 2007.

BADIEE, P.; ALBORZI, A.; JOUKAR, M. Molecular assay to detect nosocomial fungal infections in intensive care units. **European Journal of Internal Medicine**, v. 22, n. 6, p. 611–615, 2011.

BADIEE, P.; HASHEMIZADEH, Z. Opportunistic invasive fungal infections: diagnosis & clinical management. **The Indian journal of medical research**, v. 139, n. February, p. 195–204, 2014.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, p. 466–475, 2008.

BAL, B. T.; YAVUZYILMAZ, H.; YÜCEL, M. A pilot study to evaluate the adhesion of oral microorganisms to temporary soft lining materials. **Journal of oral science**, v. 50, n. 1, p. 1–8, 2008.

BALAKRISHNAN, S. et al. Antiquorum sensing and antibiofilm potential of biosynthesized silver nanoparticles of *Myristica fragrans* seed extract against MDR *Salmonella enterica serovar typhi* isolates from asymptomatic typhoid carriers and typhoid patients. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 3, p. 2844–2856, 2020.

BAMFORD, C. V. et al. *Streptococcus gordonii* modulates *Candida albicans* biofilm formation through intergeneric communication. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 9, p. 3696–3704, 2009.

BARBOSA, M. B.; FARIA, M. G. I. Produtos Naturais Como Nova Alternativa Terapêutica Para O Tratamento for the Treatment of Oral Candidiasis. **Revista UNINGÁ Review**, v. 20, n. 1, p. 103–107, 2014.

BARD, M. et al. Geraniol interferes with membrane functions in strains of *Candida* and *Saccharomyces*. **Lipids**, v. 23, n. 6, p. 1–20, 1988.

BARD, M. et al. Sterol uptake in *Candida glabrata*: Rescue of sterol auxotrophic strains. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 52, n. 4, p. 285–293, 2005.

BARROS, F. J. et al. Activity of essential oils of *Piper aduncum* and *Cinnamomum zeylanicum* by evaluating osmotic and morphologic fragility of erythrocytes. **European**

Journal of Integrative Medicine, v. 8, n. 4, p. 505–512, 2016.

BASSLER, B. L. et al. Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. **Molecular Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 773–786, 1993.

BECKERMAN, B.; PERSAUD, H. Nutmeg overdose: Spice not so nice. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 46, n. 1, p. 44–46, 2019.

BEHESHTI, F.; SMITH, A. G.; KRAUSE, G. W. Germ tube and chlamydospore formation by *Candida albicans* on a new medium. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 2, n. 4, p. 345–348, 1975.

BELENKY, P.; CAMACHO, D.; COLLINS, J. J. Fungicidal Drugs Induce a Common Oxidative-Damage Cellular Death Pathway. **Cell Reports**, v. 3, n. 2, p. 350–358, 2013.

BENEDETTI, V. P. et al. ERG11 gene polymorphisms and susceptibility to fluconazole in *Candida* isolates from diabetic and kidney transplant patients. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2019.

BENITO-CRUZ, B. et al. Oral *Candida* isolates and fluconazole susceptibility patterns in older Mexican women. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v. 65, n. 1, p. 204–210, 2016.

BERNHARD, R. A.; MARR, A. G. The oxidation of terpenes. I. Mechanism and reaction products of D- limonene autoxidation. **Journal of Food Science**, v. 25, n. 4, p. 517–530, 1960.

BESRA, M.; KUMAR, V. In vitro investigation of antimicrobial activities of ethnomedicinal plants against dental caries pathogens. **3 Biotech**, v. 8, n. 5, p. 257, maio 2018.

BIANCHI, C. M. P. DE C. et al. Factors related to oral candidiasis in elderly users and non-users of removable dental prostheses. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, 2016.

BLANK, A. F. et al. Plant spacing and harvest intervals on biomass and essential oil of geranium | Espaçamento de plantio e intervalos de colheita na biomassa e no óleo essencial de gerânio. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 740–746, 2012.

BORGHI, E. et al. Comparative evaluation of the Vitek 2 yeast susceptibility test and CLSI broth microdilution reference method for testing antifungal susceptibility of invasive fungal isolates in Italy: The GISIA3 study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 9, p. 3153–3157, 2010.

BOUKHRIS, M. et al. Hypoglycemic and antioxidant effects of leaf essential oil of *Pelargonium graveolens* L'Hér. in alloxan induced diabetic rats. **Lipids in Health and Disease**, v. 11, n. 1, p. 81, 2012.

BOUKHRIS, M. et al. Chemical composition and biological activities of polar extracts and essential oil of rose-scented geranium, *Pelargonium graveolens*. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 8, p. 1206–1213, 2013.

BRAGA, P. C. et al. Eugenol and thymol, alone or in combination, induce morphological alterations in the envelope of *Candida albicans*. **Fitoterapia**, v. 78, n. 6, p. 396–400, 2007.

BRITO, G. N. B. et al. In vitro antifungal susceptibility of *Candida* spp. oral isolates from HIV positive patients and control individuals. **Brazilian Oral Research**, v. 25, n. 1, p. 28–33, 2011.

- BROCHOT, A. et al. Antibacterial, antifungal, and antiviral effects of three essential oil blends. **MicrobiologyOpen**, v. 6, n. 4, ago. 2017.
- BURT, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223–253, 2004.
- BUTZGE, J. et al. Antifungal activity of essential oils from *Cinnamomum cassia*, *Myristica fragrans* and *Syzygium aromaticum* against *Rhodotorula mucilaginosa*. **Drug Analytical Research**, v. 4, n. 2, 2020.
- BYADARAHALLY RAJU, S.; RAJAPPA, S. Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. **ISRN dentistry**, v. 2011, n. Table 2, p. 487921, 2011.
- CADAVID, A. M. H. et al. Prevalence of Fungal Infections and the Oral Health of Hospitalized Patients in a Dermatology Service. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 129, n. 1, p. e169–e170, 2020.
- CALDERONE, R.; FONZI, W. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends in microbiology**, v. 9, n. 7, p. 327–35, 2001.
- CARDOSO, N. N. R. et al. Synergism Effect of the Essential Oil from *Ocimum basilicum* var. Maria Bonita and Its Major Components with Fluconazole and Its Influence on Ergosterol Biosynthesis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, p. 5647182, 2016.
- CARMEN, G.; HANCU, G. Antimicrobial and antifungal activity of *Pelargonium roseum* essential oils. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 4, p. 511–514, 2014.
- CARRILLO-MUNOZ, A. J. et al. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. **Revista española de quimioterapia : publicacion oficial de la Sociedad Espanola de Quimioterapia**, v. 19, n. 2, p. 130–139, 2006.
- CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 6, p. 1914–1920, 2002.
- CASAGRANDE PIERANTONI, D. et al. *Candida palmioleophila* isolation in Italy from two cases of systemic infection, after a CHROMagar and Vitek system misidentification as *C. albicans*. **The new microbiologica**, v. 43, n. 1, p. 47–50, 2020.
- CASSAGNE, C. et al. Evaluation of four pretreatment procedures for MALDI-TOF MS yeast identification in the routine clinical laboratory. **Medical Mycology**, v. 51, n. 4, p. 371–377, 2013.
- CASSAGNE, C. et al. Performance of MALDI-TOF MS platforms for fungal identification. **Mycoses**, v. 59, n. 1, p. 1–13, 2016.
- CASTRO-SILVA, I. I. et al. Relação Entre Alterações Salivares E Terapia Medicamentosa Em Adultos Jovens: Um Estudo Transversal Relation Between Salivary Alterations and Drug Therapy in Young Adults: a Cross - Sectional Study. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 18, n. 2, p. 17–24, 2017.
- CHANDRA, J. et al. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: Development, architecture, and drug resistance. **Journal of Bacteriology**, 2001.
- CHANDRA KANTHETI, L. P. et al. Isolation, identification, and carriage of candidal species in PHLAs and their correlation with immunological status in cases with and without HAART. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v. 16, n. 1, p. 38–44,

2012.

CHATZOPOULOU, P. S.; KATSIOTIS, S. T. Procedures influencing the yield and the quality of the essential oil from *Juniperus communis* L. Berries. **Pharmaceutica Acta Helveticae**, v. 70, n. 3, p. 247–253, 1995.

CHEN, L. et al. Synthesis of Novel 3,4-Chloroiso-thiazole-Based Imidazoles as Fungicides and Evaluation of Their Mode of Action. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 28, p. 7319–7327, 18 jul. 2018.

CHEN, L.; WEN, Y. M. The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies. **International Journal of Oral Science**, v. 3, n. 2, p. 66–73, 2011.

CHEN, S. C.; PLAYFORD, E. G.; SORRELL, T. C. Antifungal therapy in invasive fungal infections. **Current opinion in pharmacology**, v. 10, n. 5, p. 522–530, 2010.

CHENG, H. et al. Geographical origin identification of propolis using GC – MS and electronic nose combined with principal component analysis. **Food Research International**, v. 51, n. 1, p. 813–822, 2013.

CHENG, T. et al. Incidence of oral candidiasis is associated with inhaled corticosteroids in chinese patients: A systematic review and meta-analysis. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 10, n. 3, p. 5546–5560, 2017.

CHOI, D. et al. The Potential Regressive Role of *Syzygium aromaticum* on the Reproduction of Male Golden Hamsters. **Development & Reproduction**, v. 18, n. 1, p. 57–64, 2014.

CLARK, A. E. et al. Matrix-Assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: A fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 3, p. 547–603, 2013.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute.. M44-A2: Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline—Second Edition. **CLSI document M44-A2**, 2009.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard-; **CLSI document M27-A3**. v. 28, 2008

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute M27-S4 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Fourth Informational Supplement. **CLSI document M27-S4**, 2012

CLSI. **Clinical and Laboratory Standards Institute** Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. **CLSI document M60**, p. 1–12, 2017.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 599–607, 2003.

CORTÉS, J. A; RUSSI, J. A. Equinocandinas. **Revista Chilena de Infectologia**, v. 28, n. 6, p. 529–536, 2011.

COWEN, L. E. et al. Mechanisms of Antifungal Drug Resistance. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 5, n. 7, p. a019752, 2014.

COWEN, L. E. et al. Mechanisms of antifungal drug resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 7, p. a019752, 2015.

CUENCA-ESTRELLA, M. et al. Head-to-Head Comparison of the Activities of Currently

- Available Antifungal Agents against 3 , 378 Spanish Clinical Isolates of Yeasts and Filamentous Fungi. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 3, p. 917–921, 2006.
- CUI, J. et al. Synergistic combinations of antifungals and anti-virulence agents to fight against *Candida albicans*. **Virulence**, v. 6, n. 4, p. 362–371, 2015.
- DA SILVA, C. R. et al. Synergistic effects of amiodarone and fluconazole on *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 1691–1700, 2013.
- DABIRI, M. et al. Volatile components of *Pelargonium roseum* R.Br. **J.Essent.Oil Bearing Plants**, v. 14, n. 1, p. 114–117, 2011.
- DAGLI, N. et al. Essential oils, their therapeutic properties, and implication in dentistry: A review. **Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry**, v.5, n.5, p.335-340, 2015.
- DALLA LANA, D. F et al. Candidaemia mortality has not changed over the last 2 decades in Brazil. **Mycopathologia**. v.185, n.4, p.685-690. doi: 10.1007/s11046-020-00466-5. Epub 2020 Jun 10. PMID: 32524348
- DALLEAU, S. et al. In vitro activity of terpenes against *Candida* biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 31, n. 6, p. 572–576, 2008.
- DANDAPAT, S.; KUMAR, M.; SINHA, M. P. Therapeutic efficacy of *Cinnamomum tamala* (Buch. -Ham.) and *Aegle marmelos* (L.) leaf. **Balneo Research Journal**, v. 5, n. 3, p. 1–10, 2014.
- DANGI, Y. S.; SONI, M. L.; NAMDEO, K. P. Oral candidiasis: A review. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.2, n.4, p.36-41, 2010.
- DAR, M. S. et al. An in vitro study of antifungal drug susceptibility of *Candida* species isolated from human immunodeficiency virus seropositive and human immunodeficiency virus seronegative individuals in Lucknow population Uttar Pradesh. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v. 19, n. 1, p. 205–211, 2015.
- DE CAROLIS, E. et al. BIOF–HILO assay: A new MALDI–TOF mass spectrometry based method for discriminating between high-and low-biofilm-producing candida parapsilosis isolates. **Frontiers in Microbiology**, v.10, p.2046, 2019.
- DE LIRA, A. DE L. S.; TORRES, A. C. Relationship between oral candidiasis and users of dental prostheses. **Brazilian Journal of Oral Sciences**, v. 17, p. 1–11, 2018.
- DE LUCENA RANGEL, M. et al. In vitro effect of cinnamomum zeylanicum blume essential oil on *Candida* spp. involved in oral infections. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, n. 1, p. 1–13, 2018.
- DE MENEZES, V. M. et al. Classificação da capacidade de adesão de isolados clínicos de *Candida* spp em padrões de arranjos celulares distintos. **Revista de Patologia Tropical**, v. 42, n. 3, p. 289–300, 2013.
- DE OLIVEIRA PEREIRA, F. et al. Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against *Trichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 2, p. 228–234, 2015.
- DELATTIN, N.; CAMMUE, B. P.; THEVISSSEN, K. Reactive oxygen species-inducing antifungal agents and their activity against fungal biofilms. **Future Medicinal Chemistry**, v.6, n.1, p-77-90, 2014.
- DELAVY, M. et al. Investigating Antifungal Susceptibility in *Candida* Species With MALDI-TOF MS-Based Assays. **Frontiers in cellular and infection microbiology**,

v.9, p.19, 2019.

DELGADO, A. C. D. et al. Clinical and microbiological assessment of patients with a long-term diagnosis of human immunodeficiency virus infection and *Candida* oral colonization. **Clinical microbiology and infection**, v. 15, n. 4, p. 364–71, 2009.

DEVADAS, S. M. et al. Auxanographic carbohydrate assimilation method for large scale yeast identification. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 11, n. 4, p. DC 1-DC 3, 2017.

DIAS, I. J. et al. Antifungal activity of linalool in cases of candida spp. isolated from individuals with oral candidiasis. **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 2, p. 368–374, 2018.

DOI, A. M. et al. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. **PLoS one**, v. 11, n. 1, p. e0146909, 2016.

DOLAN, L. C.; MATULKA, R. A.; BURDOCK, G. A. Naturally occurring food toxins. **Toxins**, v. 2, n. 9, p. 2289–2332, 2010.

DONLAN, R. M. Biofilms: Microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 881–890, 2002.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, n.2, p167-193, 2002.

DOS SANTOS, M. K. et al. A chitosan hydrogel-thickened nanoemulsion containing *Pelargonium graveolens* essential oil for treatment of vaginal candidiasis. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 56, n. 1, p. 101527, 2020.

DŽAMIĆ, A. M. et al. Chemical composition, antifungal and antioxidant activity of *Pelargonium graveolens* essential oil. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 4, n. 3, p. 1–5, 2014.

EDDOUZI, J. et al. Molecular mechanisms of drug resistance in clinical *Candida* species isolated from tunisian hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 7, p. 3182–3193, 2013.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. **Phytotherapy Research**, v.21, n.4, p.308-323, 2007.

EMMANUEL, N. N. et al. Species Diversity of *Candida* from Hospital Environment in Plateau State, Nigeria. <http://www.sciencepublishinggroup.com>, 2020.

ERNST, E. J.; ROGERS, P. D. Antifungal Agents Methods and Protocols. In: **Methods in Molecular Medicine**.: Humana Press:Totowa, p. 143–152, 2005.

ESSID, R. et al. Antifungal mechanism of the combination of *Cinnamomum verum* and *Pelargonium graveolens* essential oils with fluconazole against pathogenic *Candida* strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 18, p. 6993–7001, 2017.

ESSID, R. et al. Antifungal mechanism of the combination of *Cinnamomum verum* and *Pelargonium graveolens* essential oils with fluconazole against pathogenic *Candida* strains. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 101, n. 18, p. 6993–7006, set. 2017c.

FARMACOPEIA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira, 5ª edição**, v. 1, p. 1–523, 2010.

- FERRÃO, S. K. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais frente a *Candida* spp. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 1, p. 100–113, 2020.
- FERREIRA, D. DE F. et al. Oxygen introduction during extraction and the improvement of antioxidant activity of essential oils of basil, lemon and lemongrass. **Ciência Rural**, v. 47, n. 8, p. 1–7, 2017.
- FILOGÔNIO, C. DE F. B. et al. A efetividade de óleos essenciais no controle químico do biofilme e na prevenção da cárie dentária. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 11, n. 3, p. 465–469, 2011.
- FIRMINO, D. F. et al. Antibacterial and Antibiofilm Activities of *Cinnamomum* Sp. Essential Oil and Cinnamaldehyde: Antimicrobial Activities. **Scientific World Journal**, v. 1, n. 1, p. ID 7405736, 2018.
- FLEMMING, H.-C. et al. Physico-chemical properties of biofilms. In: **Biofilms: Recent Advances in Their Study and Control**. p. 19–34, 2000.
- FRÉDÉRIC, L. J.; MICHEL, B.; SELINA, T. Oral microbes, biofilms and their role in periodontal and peri-implant diseases. **Materials**, v. 11, n. 1, p. E1802., 2018.
- FREIRES, I. A. et al. Antibacterial activity of essential oils and their isolated constituents against cariogenic bacteria: A systematic review. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 7329–7358, 2015.
- FREYDIERE, A. M.; GUINET, R.; BOIRON, P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: Phenotypical methods. **Medical Mycology**, v. 39, n. 1, p. 9–33, 2001.
- GÁCSEER, A. et al. Virulence of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in reconstituted human tissue models. **Fungal Genetics and Biology**, v. 44, n. 12, p. 1336–1341, 2007.
- GANAN, M. et al. Antibiotic saving effect of combination therapy through synergistic interactions between well-characterized chitooligosaccharides and commercial antifungals against medically relevant yeasts. **PLoS ONE**, v. 14, n. 1, p. e0210208., 2019.
- GARCÍA-AGUDO, L.; RODRÍGUEZ-IGLESIAS, M.; CARRANZA-GONZÁLEZ, R. Nosocomial Candiduria in the Elderly: Microbiological Diagnosis. **Mycopathologia**, v. 183, n. 3, p. 591–596, 2018.
- GARCIA-CUESTA, C.; SARRION-PEREZ, M. G.; BAGAN, J. V. Current treatment of oral candidiasis: A literature review. **Journal of Clinical Experimental Dentistry**, v. 6, n. 5, p. e576-82, 2014.
- GARCIA, L. G. S. et al. Effect of the molecular weight of chitosan on its antifungal activity against *Candida* spp. in planktonic cells and biofilm. **Carbohydrate Polymers**, v. 195, n. 1, p. 662- 669., 2018.
- GAVARIC, N. et al. Chemical Profile, Antioxidant and Antibacterial Activity of Thyme and Oregano Essential Oils, Thymol and Carvacrol and Their Possible Synergism. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 18, n. 4, p. 1013–1021, 2015.
- GHESHLAGHI, M.; HELWEG-LARSEN, J. Fatal chronic meningitis caused by *Candida dubliniensis* after liver transplantation. **Medical Mycology Case Reports**, v. 27, n. December 2019, p. 22–24, 2020.
- GIONGO, J. L. et al. Anti-*Candida* activity assessment of *Pelargonium graveolens* oil free and nanoemulsion in biofilm formation in hospital medical supplies. **Microbial**

Pathogenesis, v. 100, p. 170–178, 2016.

GIONGO, J. L. et al. Anti-inflammatory effect of geranium nanoemulsion macrophages induced with soluble protein of *Candida albicans*. **Microbial pathogenesis**, v. 1, n. 7, 2017.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, n.2, p.374-381, 2007.

GONDIM, B. L. C. et al. Effect of chitosan nanoparticles on the inhibition of *Candida* spp. biofilm on denture base surface. **Archives of Oral Biology**, v. 94, n. 1, p. 99–107, 2018.

GOULART, L. S. et al. Oral colonization by *Candida* species in HIV-positive patients: association and antifungal susceptibility study. **Einstein (São Paulo)**, v. 16, n. 3, p. 1–6, 2018.

GUCWA, K. et al. Investigation of the antifungal activity and mode of action of *Thymus vulgaris*, *Citrus limonum*, *Pelargonium graveolens*, *Cinnamomum cassia*, *Ocimum basilicum*, and *Eugenia caryophyllus* essential oils. **Molecules**, v. 23, n. 5, p. 8–18, 2018.

GUPTA, B. et al. Oral *Candida* prevalence and species specificity in leprosy. **Disease-a-Month**, v.66, n.7, p. 100920, 2019.

HÃDÃRUGÃ, D. I. et al. Thermal and oxidative stability of the *Ocimum basilicum* L. essential oil/ β -cyclodextrin supramolecular system. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 10, n. 1, p. 2809–2820, 2014.

HALLSTROM, H.; THUVANDER, A. Toxicological evaluation of myristicin. **Natural Toxins**, v. 5, n. 1, p. 186–192, 1997.

HANI, U. et al. Candidiasis: A fungal infection- current challenges and progress in prevention and treatment. **Infectious Disorders - Drug Targets**, v. 15, n. 1, p. 42–52, 2015.

HASHEMINEJAD, N.; KHODAIYAN, F.; SAFARI, M. Improving the antifungal activity of clove essential oil encapsulated by chitosan nanoparticles. **Food Chemistry**, v. 275, n. 1, p. 113–122, 2019.

HATWIG, C. et al. Multidrug-resistant *Candida glabrata* strains obtained by induction of anidulafungin resistance in planktonic and biofilm cells. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 55, n. 1, p. e18025, 2019.

HE, X. et al. Adherence to *Streptococci* facilitates *Fusobacterium nucleatum* Integration into an Oral Microbial Community. **Microbial Ecology**, v. 63, n. 3, p. 532–542, 2012.

HOYER, L. L.; COTA, E. *Candida albicans* agglutinin-like sequence (Als) family vignettes: A review of als protein structure and function. **Frontiers in Microbiology**, v.7, p.280, 2016.

HU, L. et al. Ca²⁺ Efflux Is Involved in Cinnamaldehyde-Induced Growth Inhibition of *Phytophthora capsici*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1–11, 2013.

HULL, C. M. et al. Facultative sterol uptake in an ergosterol-deficient clinical isolate of *Candida glabrata* harboring a missense mutation in ERG11 and exhibiting cross-resistance to azoles and amphotericin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 8, p. 4223–4232, 2012.

IRIODA, C. A. F. M. et al. Anti-inflammatory effect of *Malva sylvestris*, *Sida cordifolia*,

and *Pelargonium graveolens* is related to inhibition of prostanoid production. **Molecules**, v. 22, n. 11, p. 1–15, 2017.

ISHIKAWA, K. H. et al. A multispecies probiotic reduces oral *Candida* colonization in denture wearers. **Journal of Prosthodontics**, v. 24, n. 3, p. 194–199, 2015.

ITO, C. Y. K. et al. In vitro antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolates from patients with chronic periodontitis and from control patients. **Brazilian oral research**, v. 18, n. 1, p. 80–84, 2004.

JABALAMELI, Z. et al. Antifungal Susceptibility of *Candida* Species Isolated from Cancer Patients with Oral Lesions Undergoing Chemotherapy. **International Journal of Infection**, v. 4, n. 4, p. 10–13, 2017.

JADHAV, H. et al. Combined Impact of Ultrasound Pre-treatment and Hydrodistillation on Bioactive Compounds and GC–MS Analysis of *Cinnamomum cassia* Bark Extract. **Waste and Biomass Valorization**, p. 10.1007, 2020.

JAFRI, H.; KHAN, M. S. A.; AHMAD, I. In vitro efficacy of eugenol in inhibiting single and mixed-biofilms of drug-resistant strains of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. **Phytomedicine**, v. 54, n. 15, p. 206–213, 2019.

JAIN, M. et al. The oral carriage of candida in oral cancer patients of indian origin undergoing radiotherapy and/or chemotherapy. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 10, n. 2, p. ZC17–ZC20, 2016.

JENSEN, R. H. et al. Stepwise emergence of azole, echinocandin and amphotericin B multidrug resistance in vivo in *Candida albicans* orchestrated by multiple genetic alterations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 9, p. 2551–2455, 2015.

JIN, Y. et al. Biofilm formation of *Candida albicans* is variably affected by saliva and dietary sugars. **Archives of Oral Biology**, v. 49, n. 10, p. 789–798, 2004.

KANAFANI, Z. A.; PERFECT, J. R. Resistance to antifungal agents: Mechanisms and clinical impact. **Chinese Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 10, n. 4, p. 320, 2010.

KANNAPPAN, A. et al. Inhibitory efficacy of geraniol on biofilm formation and development of adaptive resistance in *Staphylococcus epidermidis* RP62A. **Journal of Medical Microbiology**, 2017.

KANNAPPAN, A. et al. In vitro and in vivo biofilm inhibitory efficacy of geraniol-cefotaxime combination against *Staphylococcus* spp. **Food and Chemical Toxicology**, v.125, p. 322-332, 2019.

KARKOWSKA-KULETA, J.; RAPALA-KOZIK, M.; KOZIK, A. Fungi pathogenic to humans: Molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. **Acta Biochimica Polonica**, v.56, n.2, p.211-224, 2009.

KATHIRAVAN, M. K. et al. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v.19, p.5678-98, 2012.

KEYKHOSRAVY, K. et al. Chitosan-loaded nanoemulsion containing *Zataria Multiflora* Boiss and *Bunium persicum* Boiss essential oils as edible coatings: Its impact on microbial quality of turkey meat and fate of inoculated pathogens. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 150, n. 1, p. 904–913, 2020.

KHAN, M. S. A.; AHMAD, I. Antibiofilm activity of certain phytochemicals and their synergy with fluconazole against *Candida albicans* biofilms. **Journal of Antimicrobial**

Chemotherapy, v.67, n.3, p. 618–621 2012.

KIM, Y. G. et al. *Cinnamon* bark oil and its components inhibit biofilm formation and toxin production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 195, n. 16, p. 30–39, 2015.

KIM, Y. G. et al. Essential Oils and Eugenols Inhibit Biofilm Formation and the Virulence of *Escherichia coli* O157:H7. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 36377., 2016.

KLOSTER, A. P. et al. In vitro antimicrobial effect of bioadhesive oral membrane with chlorhexidine gel. **Brazilian Dental Journal**, v. 29, n. 3, p. 354–358, 2018.

KOGA-ITO, C. Y.; LYON, J. P.; DE RESENDE, M. A. Comparison between E-test and CLSI broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* oral isolates. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 50, n. 1, p. 7–10, 2008.

KOT, B. et al. Antibiofilm activity of trans-cinnamaldehyde, p-coumaric, and ferulic acids on uropathogenic *Escherichia coli*. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 45, n. 4, p. 919–924, 2015.

KRAGH, K. N. et al. Role of multicellular aggregates in biofilm formation. **mBio**, v. 22, n. 7, p. e00237, 2016.

KUBONIWA, M.; LAMONT, R. J. Subgingival biofilm formation. **Periodontology 2000**, v. 52, n. 1, p. 38–52, 2010.

KUMAR, C. P. G.; KUMAR, S. S. J.; MENON, T. Phospholipase and proteinase activities of clinical isolates of *Candida* from immunocompromised patients. **Mycopathologia**, v. 161, n. 4, p. 213–218, 2006.

KUMAR, R.; SHUKLA, P. K. Amphotericin B resistance leads to enhanced proteinase and phospholipase activity and reduced germ tube formation in *Candida albicans*. **Fungal Biology**, v. 114, n. 2, p. 189–197, 2010.

KUMAR, S.; KUMARI, R. *Cinnamomum*: review article of essential oil compounds , ethnobotany , antifungal and antibacterial effects. **Open Access Journal of Science**, v. 3, n. 1, p. 13–16, 2019.

KUMARI, A. et al. Role of biofilm morphology, matrix content and surface hydrophobicity in the biofilm-forming capacity of various *Candida* species. **Journal of Medical Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 889–892, 2018.

LAGHA, R. et al. Antibacterial and Biofilm Inhibitory Activity of Medicinal Plant Essential Oils Against *Escherichia coli* Isolated from UTI Patients. **Molecules**, 2019.

LARA, H. H. et al. Synergistic antifungal effect of chitosan-stabilized selenium nanoparticles synthesized by pulsed laser ablation in liquids against *Candida albicans* biofilms. **International Journal of Nanomedicine**, v. 3, n. 13, p. 2697–2708, 2018.

LARANJEIRA, M. C. M.; DE FÁVERE, V. T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Química Nova**, v. 22, n. 3, p. 672–678, 2009.

LASS-FLÖRL, C.; PERKHOFER, S.; MAYR, A. In vitro susceptibility testing in fungi: A global perspective on a variety of methods. **Mycoses**, v. 53, n. 1, p. 1–11, 2010.

LEE, H.; LEE, D. G. Novel Approach into Efficient Antifungal Drug Action. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2018.

LEITE, D. P.; PIVA, M. R.; MARTINS FILHO, P. R. S. Identificação das espécies de *Candida* em portadores de estomatite protética e avaliação da susceptibilidade ao miconazol e à terapia fotodinâmica. **Revista de Odontologia da UNESP**. v. 44, n. 1,

p. 12–17, 2015.

LEITE, M. C. A. et al. Investigating the antifungal activity and mechanism(s) of geraniol against *Candida albicans* strains. **Medical Mycology**, v. 53, n. 3, p. 275–284, 2015.

LI, D. D. et al. Potent in vitro synergism of fluconazole and osthole against fluconazole-resistant *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 8, p. 1–8, 2017.

LI, X. et al. The Rpd3/Hda1 family of histone deacetylases regulates azole resistance in *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 7, p. 1993–2003, 2015.

LIAO, J. C. et al. Anti-inflammatory activities of *Cinnamomum cassia* constituents in vitro and in vivo. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2012/429320>>

LIMA-NETO, R. et al. Application of MALDI-TOF MS for requalification of a *Candida* clinical isolates culture collection. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 515–522, 2014.

LIMA OLIVEIRA, P. D. et al. Control of anthracnose caused by *Colletotrichum* species in guava, mango and papaya using synergistic combinations of chitosan and *Cymbopogon citratus* (D.C. ex Nees) Stapf. essential oil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 96–103, 2018.

LINARES, C. E. B. et al. Fluconazole and amphotericin-B resistance are associated with increased catalase and superoxide dismutase activity in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 6, p. 752–758, 2013.

LIRA, M. H. P. DE et al. Antimicrobial activity of geraniol: an integrative review. **Journal of Essential Oil Research**, v. 32, n. 3, p. 187–197, 2020.

LIU, W. et al. Synergistic antifungal effect of glabridin and fluconazole. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. e103442., 2014.

LOEFFLER, J.; STEVENS, D. A. Antifungal Drug Resistance. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, n. Supplement_1, p. S31–S41, 2003.

LOHSEA, M. B. et al. Title: Combination of antifungal drugs and protease inhibitors prevent. **BioRxiv**, v. 2, n. 11, p. 1–39, 2020.

LÓPEZ, C. et al. Comparación de diferentes métodos para la identificación de especies del género *Candida*. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 37, p. 16–21, 2005.

LÓPEZ, D.; VLAMAKIS, H.; KOLTER, R. Biofilms. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 2, n. 7, p. a000398., 2010.

LOTFALI, E. et al. Regulation of ERG3, ERG6, and ERG11 genes in antifungal-resistant isolates of *Candida parapsilosis*. **Iranian Biomedical Journal**, v. 21, n. 4, p. 275–281, 2017.

LOU, Z. et al. The antioxidant, antibacterial, antibiofilm activity of essential oil from *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* and its nanoemulsion. **LWT - Food Science and Technology**, v. 80, n. 1, p. 371–377, 2017.

LOURENÇO, A. G. et al. Oral *Candida* spp carriage and periodontal diseases in HIV-infected patients in Ribeirão Preto, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 59, p. 29, 2017.

- LU, Y. et al. CO₂ signaling through the Ptc2-Ssn3 axis governs sustained hyphal development of *Candida albicans* by reducing Ume6 phosphorylation and degradation. **mBio**, v. 10, n. 1, p. e02320-18, 2019.
- LUO, G.; SAMARANAYAKE, L. P. *Candida glabrata*, an emerging fungal pathogen, exhibits superior relative cell surface hydrophobicity and adhesion to denture acrylic surfaces compared with *Candida albicans*. **APMIS**, v. 110, n. 1, p. 601–610, 2002.
- LUQUE, A. G. et al. Oral yeast carriage in HIV-infected and non-infected populations in Rosario, Argentina. **Mycoses**, v. 52, n. 1, p. 53–59, 2009.
- LYON, J. P. et al. Predisposing conditions for *Candida* spp. carriage in the oral cavity of denture wearers and individuals with natural teeth. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 462–467, 2006.
- LYON, J. P. et al. Antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. oral isolates obtained from denture wearers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 668–672, 2008.
- MA, S. Production of Secondary Organic Aerosol from Multiphase Monoterpenes. In: **IntechOpen**. p. 363–378, 2012. Available from: <https://www.intechopen.com/books/atmospheric-aerosols-regional-characteristics-chemistry-and-physics/production-of-secondary-organic-aerosol-from-multiphase-monoterpenes>.
- MAHBOUBI, M.; MAHDIZADEH, E.; HEIDARYTABAR, R. The anti-candidal activity of *Pelargonium graveolens* essential oils against clinical isolates of *Candida albicans*. **Infection**, v. 22, n. 1, p. 9–12, 2018.
- MAHDAVI OMRAN, S. et al. In Vitro Antifungal Susceptibility of *Candida* Species Isolated from Iranian Patients with Denture Stomatitis. **BioMed Research International**, p. Article ID 3086586, 2018.
- MALUCHE, M. E.; SANTOS, J. I. DOS. *Candida* sp. e infecções hospitalares: aspectos epidemiológicos e laboratoriais. **Comparative and General Pharmacology**, v. 40, n. 1, p. 65–67, 2008.
- MANCINI, N. et al. Comparative evaluation of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass Spectrometry systems for identification of yeasts of medical importance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 7, p. 2453–2457, 2013.
- MANOHARAN, R. K.; LEE, J. H.; LEE, J. Antibiofilm and antihyphal activities of cedar leaf essential oil, camphor, and fenchone derivatives against *Candida albicans*. **Frontiers in Microbiology**, v.8, p. 1476., 2017.
- MARCHESE, A. et al. Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. **Critical reviews in microbiology**, v. 43, n. 6, p. 668–689. 2017.
- MARCOS-ARIAS, C. et al. Isolation of *Candida dubliniensis* in denture stomatitis. **Archives of Oral Biology**, v. 54, n. 2, p. 127–131, 2009.
- MARCOS-ARIAS, C. et al. Phospholipase and proteinase activities of *Candida* isolates from denture wearers. **Mycoses**, v. 54, n. 4, 2011.
- MARCOS-ARIAS, C. et al. In Vitro Activities of New Triazole Antifungal Agents, Posaconazole and Voriconazole, Against Oral *Candida* Isolates from Patients Suffering from Denture Stomatitis. **Mycopathologia**, v. 173, n. 1, p. 35–46, 2012.
- MARENCO, A. et al. Chemical and biomolecular analyses to discriminate three taxa

of *Pistacia* genus from Sardinia Island (Italy) and their antifungal activity. **Natural Product Research**, v. 32, n. 23, p. 2766–2774, 2018.

MARGARET, E.; NEERAJA, P. V. Therapeutic Properties of Jatipal - *Myristica Fragrans* . Hoult. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v. 6, n. 4, p. 385–394, 2016.

MARICHAL, P. et al. Contribution of mutations in the cytochrome P450 14 α -demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 2701–2713, 1999.

MÁRMOL, Z. et al. Quitina y Quitosano polímeros amigables . Una revisión de sus aplicaciones Chitin and Chitosan friendly polymer . A review of their applications. **Revista Tcnocientífica URU**, v. 16, n. 1, p. 53–58, 2011.

MARTEL, C. M. et al. A clinical isolate of *Candida albicans* with mutations in ERG11 (encoding sterol 14 α -demethylase) and ERG5 (encoding C22 desaturase) is cross resistant to azoles and amphotericin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 9, p. 3578–3583, 2010.

MARTINEZ, R. F. F. et al. Oral *Candida* spp carriers: its prevalence in patients with type 2 diabetes mellitus. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 88, n. 2, p. 222–225, 2013.

MARYA, C. M. et al. In vitro inhibitory effect of clove essential oil and its two active principles on tooth decalcification by apple juice. **International Journal of Dentistry**, v.2012, p. 759618, 2012.

MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119–28, 2013.

MENDANHA, S. A. et al. Toxicity of terpenes on fibroblast cells compared to their hemolytic potential and increase in erythrocyte membrane fluidity. **Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA**, v. 27, n. 1, p. 323–327, 2013.

MENDANHA, S. A.; ALONSO, A. Effects of terpenes on fluidity and lipid extraction in phospholipid membranes. **Biophysical Chemistry**, v. 198, n. 1, p. 45–54, 2015.

MENEZES, E. A. et al. In vitro synergism of simvastatin and fluconazole against *Candida* species. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.54, n.4, p, 197-199, 2012.

MEZZARI, M. et al. Prevalence of *Candida* spp. in the Dental Biofilm of Fixed Orthodontic Appliances Users. **Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre**, v. 53, n. 2, p. 5–10, 2012.

MICELI, M. H.; DÍAZ, J. A.; LEE, S. A. Emerging opportunistic yeast infections. **The Lancet Infectious Diseases**, v.11, n.2, p.142-151, 2011.

MIRANDA-CADENA, K. et al. Prevalence and antifungal susceptibility profiles of *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and their close-related species in oral candidiasis. **Archives of Oral Biology**, v. 95, n. 1, p. 100–107, 2018.

MIRON, D. et al. Antifungal activity and mechanism of action of monoterpenes against dermatophytes and yeasts. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 24, n. 1, p. 660–667, 2014.

MISHARINA, T. A.; POLSHKOV, A. N. Antioxidant properties of essential oils: Autoxidation of essential oils from laurel and fennel and of their mixtures with essential

oil from coriander. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 610–618, 2005.

MLOKA, D. A.; BWIRE, G.; MWAMBETE, K. Isolation frequency of medically important fungi and fluconazole resistant of *Candida* sp from hospital cockroaches. **Research Square**, v. 1, n. 1, p. 1–15, 2020.

MOUTAOUAFIQ, S. et al. Antifungal Activity of *Pelargonium graveolens* Essential Oil and its Fractions Against Wood Decay Fungi. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, 2019. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/0972060X.2019.1646164?needAccess=true>>

MULLER, F.; MULLER, F.; COLLEGE, M. Analysis of biofilm production and antibiofilm activity in anaerobic microbial community of human body. **International Journal of Scientific Reseach**, n. 12, p. 10–12, 2019.

MUNHUWEYI, K. et al. In vitro and in vivo antifungal activity of chitosan-essential oils against pomegranate fruit pathogens. **Postharvest Biology and Technology**, v. 129, n. 1, p. 9–22, 2017.

MUÑOZ, C. et al. Relationship Between Xerostomia and Hyposalivation in Senior Chilean People. **Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral**, v. 12, n. 3, p. 123–126, 2019.

MURCIANO, C. et al. Evaluation of the role of *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) proteins in human oral epithelial cell interactions. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, 2012.

MUTLUAY, M. M. et al. Experiments on in vivo biofilm formation and in vitro adhesion of *Candida* species on polysiloxane liners. **Gerodontology**, v. 27, n. 4, p. 283–291, 2010.

NAKAMURA, H. M.; CALDEIRA, S. M.; AVILA, M. A. G. DE. Incidência De Infecções Fúngicas Em Pacientes Cirúrgicos: Uma Abordagem Retrospectiva Incidence of Fungic Infections in Surgery Patients: a Retrospective Approach. **Revista SOBECC**, v. 18, n. 3, p. 49–58, 2013.

NAZZARO, F. et al. **Essential oils and antifungal activity** **Pharmaceuticals**, 2017.

NENOFF, P. et al. In vitro susceptibility testing of yeasts to nystatin – low minimum inhibitory concentrations suggest no indication of in vitro resistance of *Candida albicans*, *Candida* species or non-*Candida* yeast species to nystatin. **Clinical and Medical Investigations**, v. 1, n. 3, p. 71–76, 2016.

NEPPELENBROEK, K. H. et al. Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: A review of conventional, commercial, and molecular techniques. **Oral Diseases**, v. 20, n. 1, p. 329–344, 2014.

NETT, J. E.; ANDES, D. R. Antifungal Agents: Spectrum of Activity, Pharmacology, and Clinical Indications. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 51–83, 2016.

NETT, J. E.; ANDES, D. R. Contributions of the biofilm matrix to *Candida* pathogenesis. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 1, p. 33–38, 2020.

NEVES-JUNIOR, A. et al. Prevalence and fluconazole susceptibility profile of *Candida* spp. Clinical isolates in a Brazilian tertiary hospital in Minas Gerais, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 2, p. 1349–1359, 2015.

NI, J.; MAHDAVI, B.; GHEZI, S. Chemical Composition, Antimicrobial, Hemolytic, and

- Antiproliferative Activity of Essential Oils from *Ephedra intermedia* Schrenk & Mey. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 22, n. 6, p. 1562–1570, 2019.
- NUNES, M. et al. Leveduras clínicas isoladas de pacientes em unidade de terapia intensiva. **Revista eletrônica Estácio Recife**, v. 5, n. 2, p. 1–8, 2019.
- OOI, L. S. M. et al. Antimicrobial activities of Cinnamon oil and cinnamaldehyde from the Chinese medicinal herb *Cinnamomum cassia* Blume. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 34, n. 3, p. 511–522, 2006.
- OUEDRHIRI, W. et al. Antioxidant and antibacterial activities of *Pelargonium asperum* and *Ormenis mixta* essential oils and their synergistic antibacterial effect. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1–8, 2017.
- OUYANG, Q. et al. Cinnamaldehyde exerts its antifungal activity by disrupting the cell wall integrity of *Geotrichum citri-aurantii*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 1, p. PMC6364577, 2019.
- OZBAK, H. A. et al. *Cinnamomum cassia* exhibits antileishmanial activity against *Leishmania donovani* infection in vitro and in vivo. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 1, p. 1–28, 2019.
- PAILLAUD, E. et al. Oral candidiasis and nutritional deficiencies in elderly hospitalised patients. **British Journal of Nutrition**, v. 92, n. 5, p. 861–867, 2004.
- PAIXÃO DA SILVA, N. et al. Ocorrência de *Candida* na cavidade bucal de usuários de prótese dentária. **O Mundo da Saúde**, v. 39, n. 3, p. 325–332, 2015.
- PAL. MAHESH. et al. Composition and anti-microbial activity of essential oil of *Myristica fragrans* from Andaman Nicobar Island. **INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACY & LIFE SCIENCES**, v. 2, n. 10, p. 1115–1117, 2011.
- PALUCH, E. et al. Prevention of biofilm formation by quorum quenching. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 5, p. 1871–1881, 2020.
- PAMMI, M. et al. Farnesol decreases biofilms *Staphylococcus epidermidis* and exhibits synergy with nafcillin and vancomycin. **Pediatric Research**, v. 70, n. 6, p. 578–583, 2011.
- PANDA, A. et al. MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of clinical fungal isolates based on ribosomal protein biomarkers. **Journal of Microbiological Methods**, 2015.
- PANNANUSORN, S.; FERNANDEZ, V.; RÖMLING, U. Prevalence of biofilm formation in clinical isolates of *Candida species* causing bloodstream infection. **Mycoses**, v. 56, n. 3, p. 264–272, 2013.
- PAPPAS, P. G. et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, n. 4, p. e1–e50, 2015.
- PARENTE-ROCHA, J. A. et al. Antifungal Resistance, Metabolic Routes as Drug Targets, and New Antifungal Agents: An Overview about Endemic Dimorphic Fungi. **Mediators of Inflammation**, v. 1, p. 1–17, 2017.
- PARK, S. E.; PERIATHAMBY, A. R.; LOZA, J. C. Effect of surface-charged poly (methyl methacrylate) on the adhesion of *Candida albicans*. **Journal of Prosthodontics**, v. 12, n. 4, p. 249–254, 2003.
- PARK, S. J.; LEE, K. H. Influence of cell surface hydrophobicity on adhesion and biofilm formation in *Candida albicans* and several bacterial species. **Journal of**

Bacteriology and Virology, v. 48, n. 3, p. 73–80, 2018.

PATHIRANA, R. U. et al. Filamentous non-albicans *Candida* species adhere to *Candida albicans* and benefit from dual biofilm growth. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. MAY, p. 1–12, 2019.

PAUL, S. et al. Rapid detection of fluconazole resistance in *Candida tropicalis* by MALDI-TOF MS. **Medical mycology**, n. July 2017, p. 234–241, 2018.

PEIXOTO, L. R. et al. Antifungal activity, mode of action and anti-biofilm effects of *Laurus nobilis* Linnaeus essential oil against *Candida* spp. **Archives of Oral Biology**, v. 73, n. 1, p. 179–185, 2017.

PERIASAMY, G. et al. Nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.) oils. In: **Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety**. [s.l: s.n.]. p. 1–12.

PETROVIC, S. M. et al. Subgingival areas as potential reservoirs of different *Candida* spp in type 2 diabetes patients and healthy subjects. **PLoS ONE**, v. 13, n. 1, p. e0210527, 2019.

PFALLER, M. A. et al. Use of fluconazole as a surrogate marker to predict susceptibility and resistance to voriconazole among 13,338 clinical isolates of *Candida* spp. tested by clinical and laboratory standards institute-recommended broth microdilution methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 70–75, 2007.

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: Mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **American Journal of Medicine**, v. 125, n. 1 SUPPL., 2012.

PILLAI, S. et al. Anti-Parasitic Activity of *Myristica Fragrans* Houtt. Essential Oil Against Toxoplasma Gondii Parasite. **APCBEE Procedia**, v. 7–8, n. 1, p. 92–96, 2012.

PINCUS, D. H.; ORENGA, S.; CHATELLIER, S. Yeast identification - Past, present, and future methods. **Medical Mycology**, v. 45, n. 2, p. 97–121, 2007.

PINTO, E. et al. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 11, p. 1454–1462, 2009.

PIRRONE, M.; PINCIROLI, R.; BERRA, L. Microbiome, biofilms, and pneumonia in the ICU. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 29, n. 2, p. 161–166, 2016.

POURAKBARI, B. et al. Expression of Major Efflux Pumps in Fluconazole-Resistant *Candida albicans*. **Infectious Disorders - Drug Targets**, v. 17, n. 3, 2017.

PRADO, B. N.; VACCAREZZA, G. F. Alterações bucais em pacientes diabéticos. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, v. 25, n. 2, p. 147, 2013.

PRAKASH, B. et al. Prevalence of *Candida* spp. among healthy denture and nondenture wearers with respect to hygiene and age. **The Journal of Indian Prosthodontic Society**, v. 15, n. 1, p. 29, 2015.

PRASHAR, A.; LOCKE, I. C.; EVANS, C. S. Cytotoxicity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil and its major components to human skin cells. **Cell Proliferation**, v. 39, n. 4, p. 241–248, 2006.

PRATEEKSHA; BARIK, S. K.; SINGH, B. N. Nanoemulsion-loaded hydrogel coatings for inhibition of bacterial virulence and biofilm formation on solid surfaces. **Scientific Reports**, v. 9, n. 6520, p. s41598- 019-43016- w, 2019.

PUEL, A. Human inborn errors of immunity underlying superficial or invasive

candidiasis. **Human Genetics**, 2020.

R. BARÓN, M. MAYÉN, J. M. Y M. M. Efecto de dos métodos de clarificación sobre la evolución del color y fracción de polifenoles en vinos blancos finos. **Informacion Tecnologica**, v. 9, n. 1, p. 93–99, 1998.

RADÜNZ, M. et al. Antimicrobial and antioxidant activity of unencapsulated and encapsulated clove (*Syzygium aromaticum*, L.) essential oil. **Food Chemistry**, v. 276, n. 1, p. 180–186, 2019.

RAJKOWSKA, K.; NOWICKA-KRAWCZYK, P.; KUNICKA-STYCZYNSKA, A. Effect of clove and thyme essential oils on *Candida* biofilm formation and the oil distribution in yeast cells. **Molecules**, v. 24, n. 10, p. E1954, 2019.

RAMAGE, G. et al. Commercial mouthwashes are more effective than azole antifungals against *Candida albicans* biofilms in vitro. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 111, n. 4, p. 456–460, 2011.

RAO, B. R. R.; RAMESHS, S. Effect of Seasonal Climatic Changes on Biomass Yield Terpenoid Composition of Rose-scented Geranium (*Pelargonium species*) and. **Science**, v. 24, n. March, p. 627–635, 1996.

RELLOSO, M. S. et al. Evaluación de la espectrometría de masas: MALDI-TOF MS para la identificación rápida y confiable de levaduras. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 47, n. 2, p. 103–107, 2015.

REN, B. et al. ABC transporters coupled with the elevated ergosterol contents contribute to the azole resistance and amphotericin B susceptibility. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 6, p. 2609–3516., 2014.

RENGASAMY, G. et al. Cytotoxic and apoptotic potential of myristica fragrans houtt. (mace) extract on human oral epidermal carcinoma KB cell lines. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, n. 3, p. 1–7, 2018.

REVIE, N. M. et al. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. **Current Opinion in Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 70–76, 2018.

RICARDO, E. et al. Mechanisms of acquired in vivo and in vitro resistance to voriconazole by *Candida krusei* following exposure to suboptimal drug concentration. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 4, p. e01651-19, 2020.

ROBBINS, N.; WRIGHT, G. D.; COWEN, L. E. Antifungal Drugs: The Current Armamentarium and Development of New Agents. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 5, p. 1–20, 2016.

ROBERTO, A. E. et al. Rapid Detection of Echinocandins Resistance by MALDI-TOF MS in *Candida parapsilosis* Complex. **Microorganisms**, v. 8, n. 109, p. 1–13, 2020.

ROGERS, T. R. Antifungal drug resistance: limited data, dramatic impact? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, n. SUPPL. 1, p. 7–11, 2006.

ROSATO, A. et al. Elucidation of the synergistic action of *Mentha Piperita* essential oil with common antimicrobials. **PLoS ONE**, v. 13, n. 8, p. e0200902., 2018.

RUAN, S. Y. et al. Catheter-related fungemia caused by *Candida intermedia*. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 2, p. e147-9, 2010.

RYU, B. et al. A new acetophenone glycoside from the flower buds of *Syzygium aromaticum* (cloves). **Fitoterapia**, v. 115, n. 1, p. 46–51, 2016.

SAHARKHIZ, M. J. et al. Chemical Composition, Antifungal and Antibiofilm Activities of the Essential Oil of *Mentha piperita* L. **ISRN Pharmaceutics**, p. Article ID 718645,

2012.

SANITÁ, P. V. et al. Susceptibility profile of a Brazilian yeast stock collection of *Candida* species isolated from subjects with Candida-associated denture stomatitis with or without diabetes. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 116, n. 5, p. 562–569, 2013.

SANTANA, D. P. et al. Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. **Revista De Ciências Médicas E Biológicas**, 2013.

SANTOS, C. et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight intact cell mass spectrometry to detect emerging pathogenic *Candida* species. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 71, n. 3, p. 304–308, 2011.

SARASWATHI, J. et al. Phytopharmacological importance of *Pelargonium* species. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 13, p. 2587–2598, 2011.

SATO, T. et al. Prevalence of *Candida albicans* and non-*albicans* on the tongue dorsa of elderly people living in a post-disaster area: A cross-sectional survey. **BMC Oral Health**, v. 17, n. 1, p. 1–10, 2017.

SAV, H. et al. Correlation between broth microdilution and disk diffusion methods for antifungal susceptibility testing of voriconazole and fluconazole against *Candida* species. **Mycoses**, v. 58, n. SUPPL. 4, p. 64, 2015.

SCHWOB, I. et al. Changes in essential oil composition in Saint John's wort (*Hypericum perforatum* L.) aerial parts during its phenological cycle. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, n. 8, p. 735–745, 2004.

SCORZONI, L. et al. Searching new antifungals: The use of in vitro and in vivo methods for evaluation of natural compounds. **Journal of Microbiological Methods**, v. 123, n. 1, p. 68–78, 2016.

SELMECKI, A.; FORCHE, A.; BERMAN, J. Aneuploidy and isochromosome formation in drug-resistant *Candida albicans*. **Science**, v. 313, n. 5785, p. 367–370, 2006.

SELMECKI, A. M. et al. Acquisition of aneuploidy provides increased fitness during the evolution of antifungal drug resistance. **PLoS Genetics**, v. 5, n. 10, p. e1000705, 2009.

SELMECKI, A.; NEJAD, M. G.; PAULSON, C. An isochromosome confers drug resistance in vivo by amplification of two genes, ERG11 and TAC1 - Selmecki - 2008 - Molecular Microbiology - Wiley Online Library. **Molecular ...**, v. 68, n. 3, p. 624–641, 2008.

SEWELL, D. L.; PFALLER, M. A.; BARRY, A. L. Comparison of broth macrodilution, broth microdilution, and E test antifungal susceptibility tests for fluconazole. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 9, p. 2099–2102, 1994.

SHAFI, F.; PADMARAJ, S.; MULLESSERY, N. Species distribution and antifungal susceptibility pattern of *Candida* causing oral candidiasis among hospitalized patients. **Archives of Medicine and Health Sciences**, v. 3, n. 2, p. 247–251, 2015.

SHAFIEI, Z. et al. Antibacterial activity of *Myristica fragrans* against oral pathogens. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, n. 1, p. 1–7, 2012.

SHANKAR RAUT, J.; MOHAN KARUPPAYIL, S. Phytochemicals as Inhibitors of *Candida* Biofilm. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, n. 27, p. 4111–4134, 2016.

SHAO, H.; LAMONT, R. J.; DEMUTH, D. R. Autoinducer 2 is required for biofilm growth of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*. **Infection and Immunity**,

v. 75, n. 1, p. 4211–4218, 2007.

SHAO, X. et al. Effect of postharvest application of chitosan combined with clove oil against citrus green mold. **Postharvest Biology and Technology**, v. 99, n. 1, p. 37–43, 2015.

SHARMA, S. et al. Sphingolipid biosynthetic pathway genes FEN1 and SUR4 modulate amphotericin B resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 4, p. 2409–2414, 2014.

SHERRY, L. et al. Biofilms formed by isolates from recurrent vulvovaginal candidiasis patients are heterogeneous and insensitive to fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 9, p. 1–4, 2017.

SHOKRI, S. et al. Application an edible active coating based on chitosan- *Ferulago angulata* essential oil nanoemulsion to shelf life extension of Rainbow trout fillets stored at 4 °C. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 153, n. 1, p. 846–854, 2020.

SHREAZ, S. et al. Spice oil cinnamaldehyde exhibits potent anticandidal activity against fluconazole resistant clinical isolates. **Fitoterapia**, v. 82, n. 1, p. 1012–1020, 2011.

SILVA-DIAS, A. et al. Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and antifungal planktonic susceptibility: Relationship among *Candida* spp. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 1–8, 2015.

SILVA, D. M. DA et al. Virulence factors of *Candida* species from the oral mucosa and prostheses of elderly people from a riverside community in the Amazon state, Brazil. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 48, n. 1, p. 1–9, 2019.

SILVA, F. C. et al. Prevalence of *Candida* yeasts in oral samples from children with AIDS and children exposed and not exposed to HIV served by SUS in the state of Bahia, Brazil. **RGO - Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 63, n. 1, p. 07–12, 2015.

SILVA, N. C.; NERY, J. M.; DIAS, A. L. T. Aspartic proteinases of *Candida* spp.: Role in pathogenicity and antifungal resistance. **Mycoses**, 2014.

SILVA, S. et al. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species **Trends in Microbiology**, 2011.

SINGH, R.; PARIJA, S. C. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. **Indian Journal of Medical Research**, v. 136, n. 4, p. 671–673, 2012.

SINGH, S. et al. Fungicidal action of geraniol against *Candida albicans* is potentiated by abrogated CaCdr1p drug efflux and fluconazole synergism. **PLoS ONE**, v. 13, n. 8, p. e0203079., 2019.

SINGHAL, N. et al. MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1–16, 2015.

SITTERLÉ, E. et al. Large-scale genome mining allows identification of neutral polymorphisms and novel resistance mutations in genes involved in *Candida albicans* resistance to azoles and echinocandins. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 4, p. 835–848, 2020.

SOARES DA SILVA, R. et al. Prevalência de espécies de *Candida* spp. isoladas da cavidade oral e próteses dentárias removíveis de pacientes atendidos em clínica Odontológica. **Colloquium Vlitae**, v. 10, n. 1, p. 52–57, 2018.

SON, M. et al. Microfluidic study of competence regulation in *Streptococcus mutans*:

- Environmental inputs modulate bimodal and unimodal expression of comX. **Molecular Microbiology**, v. 86, n. 2, p. 258–272, 2012.
- SONG, Y. et al. Prevalence and Antifungal Susceptibility of Pathogenic Yeasts in China: A 10-Year Retrospective Study in a Teaching Hospital. **Frontiers in Microbiology**, 2020.
- SOUZA, C. M. C. et al. Antifungal activity of plant-derived essential oils on *Candida tropicalis* planktonic and biofilms cells. **Medical Mycology**, v. 54, n. 5, p. 515–523, 2016.
- STEFANOVIC, J. et al. Synthesis, characterization, and antifungal activity of nystatin-gum arabic conjugates. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 127, n. 6, p. 4736–4743, 2013.
- STEVENSON, L. G. et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization - Time of flight mass spectrometry for identification of clinically important yeast species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 10, p. 3482–3486, 2010.
- STOJKOVIĆ, D. et al. Investigation on antibacterial synergism of *Origanum vulgare* and *Thymus vulgaris* essential oils. **Archives of Biological Sciences**, v. 65, n. 2, p. 639–644, 2013.
- STRAMANDINOLI, R. T. et al. Prevalência de candidose bucal em pacientes hospitalizados e avaliação dos fatores de risco. **Rev. Sul-Bras Odontol.**, v. 7, n. 1, p. 66–72, 2010.
- SUNDSTROM, P. Adhesion in *Candida* spp. **Cellular Microbiology**, v. 4, n. 8, p. 461–469, 2002.
- SUNTHARALINGAM, P.; CVITKOVITCH, D. G. Quorum sensing in *Streptococcal* biofilm formation. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 3–6, 2005.
- SUTCU, M. et al. Epidemiologic and microbiologic evaluation of nosocomial infections associated with *Candida* spp in children: A multicenter study from Istanbul, Turkey. **American Journal of Infection Control**, v. 44, n. 10, p. 1139–1143, 2016.
- TAJ-ALDEEN, S. J. et al. Uncommon opportunistic yeast bloodstream infections from Qatar. **Medical Mycology**, v. 52, n. 5, p. 552–556, 2014.
- TAKAHASHI, N. Microbial ecosystem in the oral cavity: Metabolic diversity in an ecological niche and its relationship with oral diseases. **International Congress Series**, v. 1284, n. 1, p. 103–112, 2005.
- TAKENAKA, S.; OHSUMI, T.; NOIRI, Y. Evidence-based strategy for dental biofilms: Current evidence of mouthwashes on dental biofilm and gingivitis. **Japanese Dental Science Review**, v. 55, n. 1, p. 33–40, 2019.
- TAMURA, N. K. et al. Fatores de virulência de *Candida* spp isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 1, p. 91–93, 2007.
- TARGALSKA, M.; KUNICKA-STYCZYŃSKA, A. *Candida* Biofilms: Environmental and Clinical Aspects. In: **Intech**. [s.l: s.n.]. v. ip. 13.
- TAVARIA, F. K. et al. A quitosana como biomaterial odontológico: Estado da arte. **Revista Brasileira de Engenharia Biomedica**, v. 29, n. 1, p. 110–120, 2013.
- TEN CATE, J. M. et al. Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* biofilm formation. **Journal of Dental Research**, v. 88, n. 2, p. 105–115, 2009.
- TEO, J. Q. M. et al. Molecular mechanisms of azole resistance in *Candida* bloodstream

- isolates. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 63, p. 1–4, 2019.
- TERÇAS, A. L. G. et al. Antifungal drug susceptibility of *Candida* species isolated from HIV-positive patients recruited at a public hospital in São Luís, Maranhão, Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 298, p. 1–8, 2017.
- THIYAHUDDIN, N. M. et al. Yeast species in the oral cavities of older people: A comparison between people living in their own homes and those in rest homes. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 30, p. 1–10, 2019.
- TOUIL, H. F. Z. et al. Optimum inhibition of amphotericin-B-resistant candida albicans strain in single-and mixed-species biofilms by *Candida* and non-*Candida* terpenoids. **Biomolecules**, v. 10, n. 2, p. 342, 2020.
- TSENG, T. Y. et al. Clinical features, antifungal susceptibility, and outcome of *Candida guilliermondii* fungemia: An experience in a tertiary hospital in mid-Taiwan. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 51, n. 4, p. 552–558, 2018.
- TUREK, C.; STINTZING, F. C. Evaluation of Selected Quality Parameters to Monitor Essential Oil Alteration during Storage. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 1, p. 1365–1375, 2011.
- TUREK, C.; STINTZING, F. C. Stability of essential oils: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 1, p. 40–53, 2013.
- VALENTE, V. M. M. et al. Composition and antifungal activity of the brazilian *Myristica fragrans* houtt essential oil. **Journal of Food Safety**, v. 31, n. 2, p. 197–202, 2011
- VAN VEEN, S. Q.; CLAAS, E. C. J.; KUIJPER, E. J. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 900–907, 2010.
- VANDEPUTTE, P. et al. A nonsense mutation in the ERG6 gene leads to reduced susceptibility to polyenes in a clinical isolate of *Candida glabrata*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 10, p. 3701–3709, 2008.
- VATANSHENASSAN, M. et al. Proof of concept for MBT ASTRA, a rapid matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)-based method to detect caspofungin resistance in *Candida albicans* and *Candida glabrata*. **Journal of Clinical Microbiology**, p. e00420-18, 2018.
- VERNILLO, A. T. Dental considerations for the treatment of patients with diabetes mellitus. **Journal of the American Dental Association (1939)**, v. 134, n. 1, p. 24S–33S, 2003.
- VIEIRA, A. J. H.; SANTOS, J. I. DOS. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, p. 1–3, 2017.
- VIEIRA, C. A. et al. Estudo comparativo das espécies de em *Candida* em: sensibilidade antifúngica e genes de virulência. **Multitemas**, 2018.
- VIEIRA DE MELO, A. P. et al. Virulence factors of *Candida* spp. obtained from blood cultures of patients with candidemia attended at tertiary hospitals in Northeast Brazil. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 29, n. 2, p. 132–139, 2019.
- VIEIRA F, N. T. Resistência a Fármacos Antifúngicos por *Candida* e Abordagem Terapêutica. **Revista Portuguesa de Farmacoterapia**, v. 9, n. 1, p. 161–168, 2017.
- VIEIRA, P. R. N. et al. Chemical composition and antifungal activity of essential oils

- from *Ocimum* species. **Industrial Crops and Products**, v. 55, p. 267–271, 2014.
- VILA, T. et al. Oral candidiasis: A disease of opportunity. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 1, p. 1–28, 2020.
- VINCENT, B. M. et al. Fitness Trade-offs Restrict the Evolution of Resistance to Amphotericin B. **PLoS Biology**, v. 11, n. 10, p. e100169., 2013.
- VIVIANA, L. et al. Eucalyptus spp: *Candida albicans* Antibiofilm Activity. **EC DENTAL SCIENCE**, v. 4, n. 1, p. 824–840, 2019.
- WHALEY, S. G. et al. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-albicans *Candida* Species. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 2173, 2017.
- WINGETER, M. A. et al. Identificação microbiológica e sensibilidade in vitro de *Candida* isoladas da cavidade oral de indivíduos HIV positivos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 3, p. 272–276, 2007.
- WRIGHT, C. J. et al. Microbial interactions in building of communities. **Molecular Oral Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 83–101, 2013.
- WU, Y. et al. Antifungal Activity and Mode of Action of Miltefosine Against Clinical Isolates of *Candida krusei*. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. May, p. 1–8, 2020.
- XING, F. et al. Growth inhibition and morphological alterations of *Fusarium verticillioides* by cinnamon oil and cinnamaldehyde. **Food Control**, v. 46, p. 343–350, 2014.
- XU, J. et al. Eucalyptal D enhances the antifungal effect of fluconazole on fluconazole-resistant *Candida albicans* by competitively inhibiting efflux pump. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. 211, p. 1–10, 2019.
- XU, X. L. et al. Bacterial Peptidoglycan Triggers *Candida albicans* Hyphal Growth by Directly Activating the Adenylyl Cyclase Cyr1p. **Cell Host and Microbe**, v. 4, n. 1, p. 28–39, 2008.
- YADAV, P. et al. Evaluation of antimicrobial and antifungal efficacy of chitosan as endodontic irrigant against *Enterococcus Faecalis* and *Candida albicans* biofilm formed on tooth substrate. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, v. 9, n. 3, p. e361– e367., 2017.
- YANG, C. H.; LI, R. X.; CHUANG, L. Y. Antioxidant activity of various parts of *Cinnamomum cassia* extracted with different extraction methods. **Molecules**, v. 17, n. 6, p. 7294–304, 2012.
- YATES, R. J. Mass Spectrometry and the Age of the Proteome. **Nature**, v. 33, n. 1, p. 1–19, 1998.
- YOUNG, L. Y.; HULL, C. M.; HEITMAN, J. Disruption of ergosterol biosynthesis confers resistance to amphotericin B in *Candida lusitanae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 9, p. 2717–2729, 2003.
- YUAN, G. et al. Effect of chitosan coating combined with pomegranate peel extract on the quality of Pacific white shrimp during iced storage. **Food Control**, v. 59, n. 1, p. 818–823, 2016.
- YUMI, C. et al. In vitro antifungal susceptibility of *Candida* spp . isolates from patients with chronic periodontitis and from control patients Suscetibilidade in vitro aos antifúngicos em cepas de *Candida* spp . isoladas de pacientes com periodontite crônica e de indivíd. **In Vitro**, v. 18, n. 1, p. 2–6, 2004.
- ZEINA A. K. AND JOHN R. P. Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and

Clinical Impact. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 1, p. 120–128, 2008.

ZHANG, C. et al. *Cinnamomum cassia* Presl: A review of its traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicology. **Molecules**, v. 24, n. 19, p. 3473, 2019.

ZHANG, J. et al. Development of *Candida* -Specific Real-Time PCR Assays for the Detection and Identification of Eight Medically Important *Candida* Species. **Microbiology Insights**, v. 9, n. 1, p. 25–28, 2016.

ZHOU, Y. et al. **ERG3 and ERG11 genes are critical for the pathogenesis of *Candida albicans* during the oral mucosal infection** article **International Journal of Oral Science**, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41368-018-0013-2>>

ZOMORODIAN, K. et al. The composition, antibiofilm and antimicrobial activities of essential oil of *Ferula assa-foetida* oleo-gum-resin. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, n. March, p. 300–304, 2018.

ANEXO 1

Carta de anuência da Faculdade de Odontologia da UFRGS

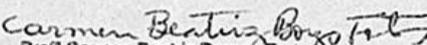
 

Universidade Federal do Rio Grande do Sul Faculdade de Odontologia
Comissão de Graduação do Curso de Odontologia

Porto Alegre, 19 de julho de 2017.

Carta de Anuência

A Comissão de Graduação do Curso de Odontologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, informa que está de acordo com a atividade prática que será realizada para execução do projeto intitulado "Perfil de sensibilidade antifúngica de isolados de *Candida* spp. em usuários de aparelhos ortodônticos ou de próteses dentárias o desenvolvimento preliminar de um enxaguante bucal a base de *Pektogonium* sp."


Profª Carmen Beatriz Borges Fortes
Coordenadora COMGRAD-CDO

Carmen Borges Fortes
Coordenadora COMGRAD-CDO
Faculdade de Odontologia UFRGS

Ilma Profª Adolína Mozzari
Faculdade de Farmácia
NU

Ramiro Barcelos, 2482 Porto Alegre-RS CEP 91065-003 Fone: 51-333085916-3305-5427 FAX:51-333085916

ANEXO II



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
COMISSÃO DE PESQUISA

PARECER 80/2017

Número do projeto no Sistema Pesquisa: 32741

Assunto: Perfil de sensibilidade antifúngica de isolados de *Candida* spp. Em usuários de aparelhos ortodônticos ou de próteses dentárias e desenvolvimento preliminar de um enxaguante bucal a base de *Pelargonium* sp.

Requerente: ADELINA MEZZARI

Finalidade: Solicitação de adendo – alteração e título e inclusão de objetivo

Relevância do Tema: O objetivo original do projeto era avaliar a prevalência, capacidade de aderência e dano celular em células epiteliais, bem como, o perfil de suscetibilidade de espécies do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal em usuários de aparelhos ortodônticos e desenvolver um enxaguatório bucal a base de *Pelargonium graveolens* eficaz no tratamento da candidíase oral. Além dos usuários de aparelhos ortodônticos, foi incluído aos objetivos a avaliação em usuários de próteses dentárias.

Adequação da metodologia e fundamentação teórica: O delineamento metodológico mostra-se adequado para a execução do projeto e atende aos objetivos propostos. A fundamentação teórica está de acordo com o tema.

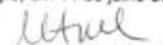
Viabilidade de execução face às condições da Instituição: O cronograma de trabalho está adequado.

Adequação da equipe às necessidades do Projeto: O coordenador possui capacitação reconhecida para execução das metas apontadas no estudo, assim como todos os membros colaboradores do projeto.

Adequação dos procedimentos para descarte dos resíduos: adequado.

Conclusão: No que se refere aos aspectos éticos, há necessidade de encaminhamento do projeto a Plataforma Brasil e CEP pertinente. Considerando o exposto, o parecer da COMPEQ/FAR é favorável à aprovação do projeto.

Porto Alegre, em 11 de julho de 2017.


Prof.ª Dra. Miriam Andreia Apet
Coordenadora COMPEQ/FAR

T

ANEXO III



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Perfil de sensibilidade antifúngica de isolados de *Candida* spp. em usuários de aparelhos ortodônticos ou de próteses dentárias e desenvolvimento preliminar de um enxaguante bucal a base de *Pelargonium* sp.

Pesquisador: Adelina Mezzari

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 70217617.3.0000.5347

Instituição Proponente: Faculdade de Farmácia

Patrocinador Principal: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.236.863

Apresentação do Projeto:

Trata-se do projeto de pesquisa que tem como pesquisador responsável Adelina Mezzari, intitulado "Perfil de sensibilidade antifúngica de isolados de *Candida* spp. em usuários de próteses dentárias e desenvolvimento preliminar de um enxaguante bucal a base de *Pelargonium* sp." a ser executado de 09/2017 a 12/2020 e que pretende avaliar a prevalência, capacidade de aderência e dano celular em células epiteliais, bem como, o perfil de suscetibilidade de espécies do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal em usuários de próteses dentárias e desenvolver um enxaguatório bucal a base de *Pelargonium graveolens* eficaz no tratamento da candidíase oral.

Como hipótese, os pesquisadores informam que "as próteses são construídas de uma resina porosa constituindo um sítio favorável para o desenvolvimento de microrganismos como bactérias e fungos. Tem sido demonstrado em estudos publicados anteriormente que o uso diário de um enxaguante bucal fornece um benefício significativo para a saúde do paciente tanto na prevenção quanto no tratamento de infecções fúngicas da cavidade oral. Contudo poucos estudos sobre a utilização de óleo essencial como agente antifúngico no enxaguante bucal tem sido realizados.

Foi apresentada uma fundamentação teórica bem estruturada, considerando aspectos relativos ao

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha **CEP:** 90.040-060
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br



UFRGS - PRÓ-REITORIA DE
PESQUISA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO GRANDE DO



Continuação do Parecer: 2.236.863

gênero *Candida*, agentes antifúngicos e a espécie *Pelargonium graveolens*.

Trata-se de um projeto que é avaliado somente pelo CEP/UFRGS (Instituição Proponente).

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a prevalência, capacidade de aderência e dano celular em células epiteliais, bem como, o perfil de suscetibilidade de espécies do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal em usuários de próteses dentárias e desenvolver um enxaguatório bucal a base de *Pelargonium graveolens* eficaz no tratamento da candidíase oral.

Como objetivos específicos:

- Avaliar a prevalência e a distribuição das espécies de *Candida* spp. isoladas da cavidade oral em usuários próteses dentárias e relacionar com seus hábitos e características;
- Avaliar a condição geral de saúde do paciente através do hemograma;
- Determinar o perfil de suscetibilidade das espécies de *Candida* isoladas da cavidade oral de usuários de próteses dentárias para fluconazol, itraconazol e cetoconazol pelo método E-teste;
- Determinar a capacidade de aderência das espécies de *Candida* isoladas da cavidade bucal em usuários de próteses dentárias da célula epitelial oral;
- Avaliar o dano celular em células epiteliais bucais após a infecção de espécies de *Candida* isoladas da cavidade bucal de usuários de próteses dentárias através da dosagem da enzima lactato desidrogenase LDH no meio;
- Preparo e caracterização de microemulsões do óleo essencial *Pelargonium graveolens*;
- Desenvolver enxaguatório bucal a base de *Pelargonium graveolens*;
- Avaliar a eficácia do enxaguatório bucal desenvolvido a base de *Pelargonium graveolens* para uso em candidíase através da determinação da difusão em meio utilizando a técnica de discos

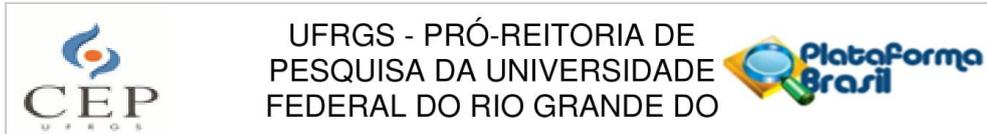
Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Na nova tramitação, como riscos, os pesquisadores informam que “os riscos serão mínimos. O desconforto poderá ocorrer no momento da coleta do material devido a uso do swab ou da coleta de sangue.” (PENDÊNCIA ATENDIDA).

Como benefícios, os pesquisadores relatam que “será o diagnóstico preciso das espécies do fungo, bem como sua resistência aos antifúngicos e a perspectiva da utilização de um antisséptico oral e

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha **CEP:** 90.040-060
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br

Página 02 de 06



Continuação do Parecer: 2.236.863

natural.”

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo será realizado na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul nos Laboratórios de Micologia e Toxicologia. Foram apresentados os Termos de Concordância dos laboratórios para execução do presente projeto. (PENDÊNCIA ATENDIDA).

Segundo os pesquisadores, está prevista uma amostra de 22 pacientes para cada grupo determinação da prevalência de Candida. Sendo o trabalho constituído de 3 grupos: grupo controle, próteses totais e próteses parciais. Foi indicado o cálculo de tamanho amostral.

Na segunda versão, os pesquisadores incluíram cartaz de divulgação da pesquisa redigido de maneira adequada (PENDÊNCIA ATENDIDA).

A amostra será coletada através de um swab estéril da mucosa palatina e da prótese e também será realizada coleta de sangue. A seguir, serão realizadas as seguintes etapas:

1. Identificação dos isolados;
2. Produção de tubo germinativo e clamidoconídios;
3. Provas bioquímicas;
4. Perfil de suscetibilidade;
5. Capacidade de aderência: Para a realização da técnica de aderência serão coletadas primeiramente células epiteliais da boca de indivíduos saudáveis (sem sintomas de candidíase) utilizando swab
6. Determinação de dano celular;
7. Preparo e caracterização da microemulsão do óleo essencial a partir de óleo essencial de Pelargonium sp.. Cabe ressaltar que o pesquisador deverá atentar para as autorizações ambientais necessárias para trabalho com flora de acordo com a legislação vigente;
8. Desenvolvimento de um enxaguante bucal
9. Avaliação da eficácia do enxaguante bucal: estabilidade, propriedades físico-químicas, eficácia do enxaguante bucal pelo método de difusão em meio sólido.

Como estes experimentos serão realizados no grupo controle partindo-se da premissa que este não terão a presença do agente infeccioso? No retorno de pendência, os pesquisadores esclarecem

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha **CEP:** 90.040-060
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br



Continuação do Parecer: 2.236.863

natural.”

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo será realizado na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul nos Laboratórios de Micologia e Toxicologia. Foram apresentados os Termos de Concordância dos laboratórios para execução do presente projeto. (PENDÊNCIA ATENDIDA).

Segundo os pesquisadores, está prevista uma amostra de 22 pacientes para cada grupo determinação da prevalência de Candida. Sendo o trabalho constituído de 3 grupos: grupo controle, próteses totais e próteses parciais. Foi indicado o cálculo de tamanho amostral.

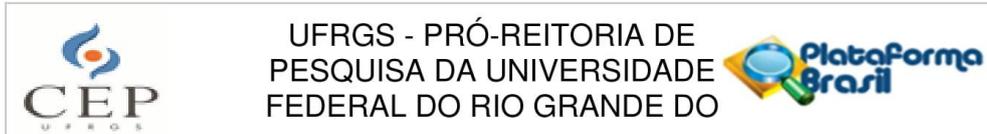
Na segunda versão, os pesquisadores incluíram cartaz de divulgação da pesquisa redigido de maneira adequada (PENDÊNCIA ATENDIDA).

A amostra será coletada através de um swab estéril da mucosa palatina e da prótese e também será realizada coleta de sangue. A seguir, serão realizadas as seguintes etapas:

1. Identificação dos isolados;
2. Produção de tubo germinativo e clamidoconídios;
3. Provas bioquímicas;
4. Perfil de suscetibilidade;
5. Capacidade de aderência: Para a realização da técnica de aderência serão coletadas primeiramente células epiteliais da boca de indivíduos saudáveis (sem sintomas de candidíase) utilizando swab
6. Determinação de dano celular;
7. Preparo e caracterização da microemulsão do óleo essencial a partir de óleo essencial de Pelargonium sp.. Cabe ressaltar que o pesquisador deverá atentar para as autorizações ambientais necessárias para trabalho com flora de acordo com a legislação vigente;
8. Desenvolvimento de um enxaguante bucal
9. Avaliação da eficácia do enxaguante bucal: estabilidade, propriedades físico-químicas, eficácia do enxaguante bucal pelo método de difusão em meio sólido.

Como estes experimentos serão realizados no grupo controle partindo-se da premissa que este não terão a presença do agente infeccioso? No retorno de pendência, os pesquisadores esclarecem

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha **CEP:** 90.040-060
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propeq.ufrgs.br



Continuação do Parecer: 2.236.863

que "O grupo controle também poderá apresentar Candida spp. na cavidade oral. Os testes da eficácia serão realizados em laboratório "in vitro" e não no paciente, conforme descrição no projeto item 3.14.4. independentemente se o isolado for dos pacientes ou do grupo controle." (PENDÊNCIA ATENDIDA).

Ressalta-se que não está previsto nenhuma etapa de aplicação em seres humanos.

Foi apresentado cronograma, orçamento e fonte de financiamento.

Foi apresentado um questionário de coleta de dados e codificado (PENDÊNCIA ATENDIDA)

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Para esta tramitação, foi apresentado projeto completo, folha de rosto assinada e TCLE.

Em relação ao TCLE, foram apresentados dois modelos, uma para grupo controle e outro para indivíduos com prótese parcial ou total.

Na nova tramitação, o TCLE foi novamente apresentado, destacando-se:

- linguagem foi adequada e simplificada;
- riscos foram adequados conforme já solicitado anteriormente;
- na segunda versão foi citado na introdução: "Será preparado neste projeto um enxaguante bucal como uma alternativa inovadora para este tratamento." Isso poderia passar a ideia ao participante de que ele testará o enxaguante bucal, quando na verdade será testado somente in vitro. Na nova versão foi readequado para "Será preparado neste projeto um enxaguante bucal para ser testado primeiramente nos isolados de Candida spp. e se o mesmo se mostrar eficiente como alternativa para tratamento poderá posteriormente ser usado por indivíduos que apresentarem candidíase oral, o que seria uma alternativa inovadora para este tratamento". (PENDENCIA ATENDIDA)
- no TCLE dos controles, foi acrescentada uma frase que ficou redigida sem sentido "Se você não for usuário de aparelhos ortodônticos ou de próteses dentárias." Na nova tramitação foi adequado para "Se você não for usuário de aparelho ortodôntico ou de próteses dentárias, poderá fazer parte desta pesquisa" (PENDENCIA ATENDIDA)
- da mesma forma, no TCLE dos pacientes, foi acrescentado "Se você tiver for usuário de aparelhos

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha **CEP:** 90.040-060
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br

Página 04 de 06



UFRGS - PRÓ-REITORIA DE
PESQUISA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO GRANDE DO



Continuação do Parecer: 2.236.863

que "O grupo controle também poderá apresentar *Candida spp.* na cavidade oral. Os testes da eficácia serão realizados em laboratório "in vitro" e não no paciente, conforme descrição no projeto item 3.14.4. independentemente se o isolado for dos pacientes ou do grupo controle." (PENDÊNCIA ATENDIDA).

Ressalta-se que não está previsto nenhuma etapa de aplicação em seres humanos.

Foi apresentado cronograma, orçamento e fonte de financiamento.

Foi apresentado um questionário de coleta de dados e codificado (PENDÊNCIA ATENDIDA)

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Para esta tramitação, foi apresentado projeto completo, folha de rosto assinada e TCLE.

Em relação ao TCLE, foram apresentados dois modelos, uma para grupo controle e outro para indivíduos com prótese parcial ou total.

Na nova tramitação, o TCLE foi novamente apresentado, destacando-se:

- linguagem foi adequada e simplificada;
- riscos foram adequados conforme já solicitado anteriormente;
- na segunda versão foi citado na introdução: "Será preparado neste projeto um enxaguante bucal como uma alternativa inovadora para este tratamento." Isso poderia passar a ideia ao participante de que ele testará o enxaguante bucal, quando na verdade será testado somente in vitro. Na nova versão foi readequado para "Será preparado neste projeto um enxaguante bucal para ser testado primeiramente nos isolados de *Candida spp.* e se o mesmo se mostrar eficiente como alternativa para tratamento poderá posteriormente ser usado por indivíduos que apresentarem candidíase oral, o que seria uma alternativa inovadora para este tratamento". (PENDENCIA ATENDIDA)
- no TCLE dos controles, foi acrescentada uma frase que ficou redigida sem sentido "Se você não for usuário de aparelhos ortodônticos ou de próteses dentárias." Na nova tramitação foi adequado para "Se você não for usuário de aparelho ortodôntico ou de próteses dentárias, poderá fazer parte desta pesquisa" (PENDENCIA ATENDIDA)
- da mesma forma, no TCLE dos pacientes, foi acrescentado "Se você tiver for usuário de aparelhos

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha **CEP:** 90.040-060
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propeq.ufrgs.br

Página 04 de 06



UFRGS - PRÓ-REITORIA DE
PESQUISA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO GRANDE DO



Continuação do Parecer: 2.236.863

Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_PACIENTE.pdf	13:22:09	Adelina Mezzari	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_CONTROLE.pdf	03/08/2017 13:21:43	Adelina Mezzari	Aceito
Outros	CartaAnuenciaOdonto.jpg	25/07/2017 11:46:23	Adelina Mezzari	Aceito
Outros	Cartaz_de_divulgacao.pdf	17/07/2017 08:40:46	Adelina Mezzari	Aceito
Outros	Carta_de_anuencia_Depto.pdf	17/07/2017 08:39:36	Adelina Mezzari	Aceito
Outros	candidaQuest.pdf	17/07/2017 08:38:52	Adelina Mezzari	Aceito
Outros	AprovacaoCompesqSegundaVersao.pdf	17/07/2017 08:37:50	Adelina Mezzari	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_final_atualizado.pdf	14/07/2017 15:49:00	Adelina Mezzari	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRostoAssinadaSegundaVersao.pdf	14/07/2017 15:47:31	Adelina Mezzari	Aceito

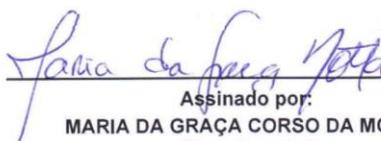
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 24 de Agosto de 2017


Assinado por:
MARIA DA GRAÇA CORSO DA MOTTA
(Coordenador)

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha **CEP:** 90.040-060
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br