

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE-UFCG
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BACHARELADO EM ODONTOLOGIA

JOYCE NATIELLE MIRANDA CAVALCANTE

**BIOPROSPECÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Pogostemon cablin (LAMIACEAE) CONTRA CEPAS DE *Candida tropicalis***

PATOS - PB
2019

JOYCE NATIELLE MIRANDA CAVALCANTE

BIOPROSPECÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Pogostemon cablin (LAMIACEAE) CONTRA CEPAS DE *Candida tropicalis*

Trabalho de Conclusão do Curso (TCC)
apresentado à Coordenação do Curso de
Odontologia da Universidade Federal de
Campina Grande - UFCG, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Bacharel em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Abrahão Alves de
Oliveira Filho

PATOS - PB
2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSRT DA UFCG

C377b Cavalcante, Joyce Natielle Miranda
Bioprospecção da atividade antifúngica do óleo essencial de *Pogostemon cablin* (Lamiaceae) contra cepas de *Candida tropicalis* / Joyce Natielle Miranda Cavalcante. – Patos, 2019.
29f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Odontologia) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2019.

"Orientação: Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho".

Referências.

1. *Pogostemon cablin*. 2. Produto natural. 3. *Candida tropicalis*.
I. Título.

CDU 616-085:619

JOYCE NATIELLE MIRANDA CAVALCANTE

**BIOPROSPECÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Pogostemon cablin (LAMIACEAE) CONTRA CEPAS DE *Candida tropicalis***

Trabalho de Conclusão do Curso (TCC) apresentado à Coordenação do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

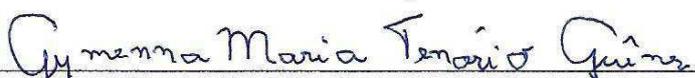
Orientador: Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho

Aprovado em 19/05/19

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho – Orientador
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG



Profa. Dra. Gymenna Maria Tenório Guênes
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG



Profa. Dra. Maria Angélica Sátyro Gomes Alves
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG

AGRADECIMENTOS

“Se fosse preciso, começaria tudo outra vez do mesmo jeito, andando pelo mesmo caminho de dificuldades, pois a fé, que nunca me abandona, me daria forças para ir sempre em frente.” – Irmã Dulce.

Primeiramente agradeço a Deus, por ter cumprido em mim sua vontade, por ser primordial em minha vida, Senhor de meu destino, meu guia, o princípio e o fim.

A Virgem Maria, por ser meu regaço acolhedor, exemplo de fidelidade, minha companhia na Cruz e no Calvário e por sempre me levar a Deus.

Aos meus pais, Joelson e Giselle, aos meus avós Severino, Denise (*In Memoriam*), José e Eunice, ao meu irmão Jordano, a minha cunhada Marília e toda minha família, pilares da minha vida, e que, com muito apreço nunca mediram esforços para que eu chegasse até aqui. Hoje estamos colhendo o fruto do nosso empenho, dedico essa conquista a vocês.

Aos meus amigos e a família EJC, pelas alegrias, tristezas, dificuldades e vitórias compartilhadas. Valeu a pena toda distância, todo sofrimento e todas as renúncias, esse TCC também é de vocês.

A todos os meus professores que foram tão importantes na minha formação acadêmica, humanística e pessoal. Sem eles não seria possível estar aqui, hoje, com o coração repleto de orgulho.

Ao meu orientador professor Abrahão, pela paciência, incentivo, dedicação e confiança. Seus ensinamentos para além da LAFBIM foram de extrema importância. Manifesto aqui minha eterna gratidão por compartilhar conosco sua sabedoria, seu tempo e sua experiência.

A UFCG – Campus Patos, que se tornou minha segunda casa durante esses cinco anos, bem como todos os funcionários e pacientes que fazem o curso de Odontologia acontecer.

E por fim, a quem eu não mencionei, mas que esteve junto comigo, compartilhando dessa caminhada.

CAVALCANTE, J. N. M. **Bioprospecção da atividade antifúngica do óleo essencial de *Pogostemon cablin* (Lamiaceae) contra cepas de *Candida tropicalis***. Patos, Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, 2019, 29p.

RESUMO

A levedura do gênero *Candida* é muito frequente na mucosa oral de indivíduos saudáveis. Porém, quando há quebra dos mecanismos de defesa do hospedeiro, esta levedura pode causar uma proliferação ou infecção da cavidade bucal. Os métodos convencionais para o tratamento de candidíase, superficial ou sistêmica, são baseados na utilização de agentes antifúngicos, como: nistatina, anfotericina B, miconazol, cetoconazol, entre outros. No entanto, são observados vários inconvenientes quando da utilização dos mesmos, representados por toxicidade, interações antagônicas fármaco-fármaco, falta de eficácia fungicida, alto custo e surgimento de espécies resistentes causados pela utilização frequente de alguns deles. Na busca por novas estratégias terapêuticas para a candidíase oral, estudos utilizando plantas medicinais estão sendo cada vez mais realizados. Esse trabalho procura analisar a possível atividade antifúngica do óleo essencial de *Pogostemon cablin* contra cepas de *Candida tropicalis*. Para a determinação da CIM (Concentração Inibitória Mínima) do óleo essencial, foi realizada a técnica da microdiluição em caldo. Utilizaram-se as seguintes cepas de *Candida tropicalis* (ATCC 13803, LM 04, LM 20 e LM 64). Foi realizado controle de viabilidade das cepas ensaiadas, e também controle de sensibilidade destas cepas ao antimicrobiano anfotericina B. As placas foram assepticamente fechadas e incubadas a 35°C por 24 - 48hrs e se realizou a leitura. Diante dos resultados observou-se que para a cepa do tipo ATCC 13803 a CIM foi de 128 µg/ml, para a LM 64 foi de 32 µg/ml, no entanto, para as cepas LM 04 e 20 o óleo essencial apresentou uma CIM de >1024 µg/mL. Já para a Concentração Fungicida Mínima (CFM) os valores foram os mesmos que a CIM, respeitando suas respectivas cepas. Pode – se então concluir que o óleo essencial de *Pogostemon cablin* possui uma forte atividade antimicrobiana de caráter fungicida contra cepas de *Candida tropicalis*, sendo uma substância passível para a realização de novos estudos.

Palavras-chave: *Pogostemon cablin*, Produto natural, *Candida tropicalis*.

ABSTRACT

Candida yeast is very common in the oral mucosa of healthy individuals. However, when there is a breakdown of host defense mechanisms, this yeast may cause a proliferation or infection of the oral cavity. Conventional methods for the treatment of candidiasis, superficial or systemic, are based on the use of antifungal agents, such as: nystatin, amphotericin B, miconazole, ketoconazole, among others. However, several drawbacks are observed when using them, represented by toxicity, antagonistic drug-drug interactions, lack of fungicidal efficacy, high cost and emergence of resistant species caused by the frequent use of some of them. In the search for new therapeutic strategies for oral candidiasis, studies using medicinal plants are being increasingly performed. This work analyzes the possible antifungal activity of *Pogostemon cablin* essential oil against *Candida tropicalis* strains. For the determination of MIC (Minimum Inhibitory Concentration) of the essential oil, the broth microdilution technique was performed. The following strains of *Candida tropicalis* (ATCC 13803, LM 04, LM 20 and LM 64) were used. Viability control of the strains tested, as well as the sensitivity control of these strains to the antimicrobial amphotericin B were performed. The plates were aseptically closed and incubated at 35 ° C for 24-48hrs and read. In view of the results it was observed that for the ATCC type 13803 the MIC was 128 µg / ml, for the LM 64 it was 32 µg / ml, however, for the LM 04 and 20 strains the essential oil had a MIC of > 1024 µg / ml. For the Minimum Fungicide Concentration (CFM), the values were the same as the MIC, respecting their respective strains. It can be concluded that the essential oil of *Pogostemon cablin* has a strong fungicidal antimicrobial activity against strains of *Candida tropicalis*, being a substance susceptible to new studies.

Key words: *Pogostemon cablin*, Natural product, *Candida tropicalis*.

LISTA DE TABELA

TABELA 1 - Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) em $\mu\text{g/mL}$ do óleo essencial de *Pogostemon cablin* contra diferentes cepas de *Candida tropicalis* 21

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ASD	Ágar de dextrose Sabouraud
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>C. krusei</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>C. parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>C. tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DCF	Departamento de Ciências Farmacêuticas
DMSO	Dimetil-sulfóxido
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana.
mL	Mililitros
NaCl	Cloreto de Sódio
°C	Graus Celsius
OE	Óleo Essencial
<i>P. cablin</i>	<i>Pogostemon cablin</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande
µg	Microgramas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	09
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
3. REFERÊNCIAS.....	14
4. ARTIGO.....	17
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	25
6. ANEXO.....	26

1. INTRODUÇÃO

A levedura do gênero *Candida* é muito frequente na mucosa oral de indivíduos saudáveis, sua taxa de prevalência varia de 20 a 70%. Contudo, quando há quebra dos mecanismos de defesa do hospedeiro, esta levedura pode causar uma proliferação ou infecção da cavidade bucal, observada principalmente na primeira infância, senescência e em pacientes imunocomprometidos (ROSSI et al., 2011).

A candidíase oral foi descrita como doença associada aos primeiros casos descritos na literatura de AIDS (síndrome da imunodeficiência adquirida), constituindo a infecção fúngica mais frequente em pacientes HIV positivos. Considera-se que até 90% dos indivíduos infectados pelo vírus HIV sofrerão pelo menos um episódio de candidíase orofaríngea (BARBEDO; SGARBI, 2010).

Segundo Pfaller e Diekema (2007), mais de 17 espécies diferentes do gênero *Candida* são conhecidas como agentes etiológicos de infecções em humanos, entretanto mais de 90% das infecções invasivas são causadas por *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*.

Os métodos convencionais para o tratamento de candidíase, superficial ou sistêmica, são baseados na utilização de agentes antifúngicos, como: nistatina, anfotericina B, miconazol, cetoconazol, entre outros. Porém, são observados vários inconvenientes quando da utilização dos mesmos, representados por toxicidade, interações antagônicas fármaco-fármaco, falta de eficácia fungicida, alto custo e surgimento de espécies resistentes, causado pela utilização frequente de alguns deles (PINTO et al., 2009; YAMADA et al., 2016).

Além disso, apesar da introdução de novas drogas antifúngicas, elas ainda são em número limitado, evidenciando, portanto, uma grande demanda por novos agentes antifúngicos mais eficazes e menos tóxicos. Nesse contexto, desponta a utilização de metabólitos extraídos de plantas medicinais para este fim (PINTO et al., 2009; YAMADA et al., 2016).

Cerca de 80% da população de países em desenvolvimento se utilizam das plantas medicinais como forma de tratamento de suas enfermidades. Este fato amplia a perspectiva para o desenvolvimento de pesquisas com plantas com a finalidade de propor alternativas que contribuam para qualificação e ampliação dos cuidados primários em saúde. O alto custo de medicamentos industrializados e a falta de acesso

da população a serviços de saúde também impulsionam o crescente uso como métodos alternativos e complementares (CALIXTO, 2003; BOCHNER et al., 2012).

Na busca por novas estratégias terapêuticas para a candidíase oral, estudos utilizando óleos essenciais de plantas estão sendo cada vez mais realizados. Tais substâncias consistem em misturas complexas (formada principalmente por mono e sesquiterpenos alifáticos ou aromáticos) que se apresenta em diferentes proporções (ROSSEL et al., 2008).

Desta forma, com base nas informações sobre o potencial terapêutico dos óleos essenciais de plantas medicinais e a importância do combate às infecções causadas por leveduras do gênero *Candida*, esse trabalho procura avaliar a possível atividade antifúngica do óleo essencial de *Pogostemon cablin* (Lamiaceae) contra cepas de *C. tropicalis*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

O gênero *Candida* é constituído de aproximadamente 200 espécies diferentes de leveduras, que colonizam diversos sítios corpóreos, tais como, orofaringe, cavidade bucal, dobras da pele, secreções brônquicas, vagina, urina e fezes (SCHULZE; SONNENBORN, 2009).

As leveduras do gênero *Candida* são constituintes presentes da microbiota da pele e mucosa do homem, desde o nascimento. A relação de convivência levedura/hospedeiro ocorre ao longo da vida, porém quaisquer alterações na homeostase do organismo humano, como mudanças orgânicas, físico-químicas, fisiológicas ou patológicas tanto da pele como nas mucosas, favorecem a manifestação infecciosa deste fungo leveduriforme (RIBEIRO et al., 2004).

Uma vez que as espécies do gênero *Candida* fazem parte da microbiota humana, infecções pelas mesmas são consideradas oportunistas, tornando-se patogênicas caso ocorram alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro. Alguns fatores individuais contribuem para as infecções por *Candida*, dentre os quais se podem destacar: o rompimento das barreiras cutânea e mucosa, disfunção dos neutrófilos, defeito na imunidade mediada por células, desordem metabólica, exposição direta aos fungos, extremos de idade (recém-nascidos e idosos), desnutrição aguda, longo tratamento com antibióticos, quimioterapia, transplantes, resistência a antifúngicos, dentre outros (BARBEDO; SGARBI, 2010).

A candidíase oral é uma doença oportunista, pois uma vez que o sistema imunológico está comprometido, ela se desenvolve e se instaura no organismo, ou seja, a integridade imune do hospedeiro é importante como fator para que a *Candida sp.* continue se comportando como comensal e não se proliferar excessivamente causando a candidíase (NASUTION, 2013).

Nas últimas décadas, a candidíase vem se tornando mais recorrente devido à higiene bucal mal realizada, tratamentos prolongados que utilizam antibióticos indiscriminadamente, queda da imunidade, entre outros fatores (MOREIRA et al., 2011).

Em relação ao tratamento da candidíase oral, grande quantidade de fármacos obtidos por meio da síntese orgânica tem sido utilizada no tratamento de infecções micóticas, como os antissépticos à base de tintura de iodo, violeta de genciana, ácido salicílico e benzoico, derivados sulfamídicos, corantes, quinonas e antifúngicos poliênicos (nistatina, anfotericina). Além desses, utilizam-se também antifúngicos como

os azóis (cetoconazol, econazol, sulconazol, miconazol, clotrimazol e fluconazol) e anfotericina B. Porém, as infecções fúngicas são de difícil tratamento, fato relacionado à elevada resistência da *Candida* frente à ação de alguns antifúngicos convencionais (ARAÚJO et al., 2004; VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012).

A crescente resistência aos antifúngicos, as limitações terapêuticas, a ineficácia, a toxicidade, as interações medicamentosas e a biodisponibilidade insuficiente das drogas antifúngicas atualmente disponíveis tornam o tratamento das micoses humanas muito difícil e estimulam a busca por novas alternativas terapêuticas entre as plantas aromáticas e seus óleos essenciais, empiricamente usados por apresentar propriedades antifúngicas (BARBERÁN et al., 2008; CAVALEIRO et al., 2006; SILVA; PAULA; ESPINDOLA, 2009).

Plantas medicinais e aromáticas são amplamente empregadas na medicina popular e têm sido extensivamente estudadas a fim de encontrar compostos mais eficazes e menos tóxicos. Constituem uma importante fonte de novos compostos biologicamente ativos (NAKAMURA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2006; PRABUSEENIVASAN; JAYAKUMAR; IGNACIMUTHU, 2006), contendo uma série de substâncias que podem ser usadas para o tratamento de diferentes doenças infecciosas (SAAD et al., 2010).

Os óleos essenciais, misturas de compostos voláteis originados do metabolismo secundário das plantas, são uma rica fonte de compostos biologicamente ativos (GONÇALVES et al., 2003). A composição química do óleo essencial depende do clima, da estação do ano, das condições geográficas, do período de colheita e da técnica de destilação (MACIEL et al., 2002).

Estes óleos podem ser encontrados em todos os órgãos, ou seja, folhas, flores, caules, ramos, sementes, frutos, raízes e cascas. Na natureza estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência do vegetal, exercendo papel fundamental na defesa contra micro-organismos. Eles também podem atrair alguns insetos que favoreçam a dispersão do pólen e sementes, ou repelir outros indesejáveis (BAKKALI et al., 2008; SANTOS, 2004).

Os óleos essenciais de plantas podem ser obtidos principalmente através de destilação por arraste com vapor de água ou destilação por pressão reduzida e são conhecidos desde a antiguidade por possuir propriedades antibacterianas e antifúngicas (CAVALEIRO et al., 2006; COWAN, 1999; TEMPONE et al., 2008).

Uma família que está presente em todas as regiões do Brasil é a Lamiaceae, que compreende cerca de 7000 espécies de plantas e que na sua maioria são produtoras de óleos essenciais (FALCÃO; FERNANDES; MENESES, 2003).

Dentre as espécies desta família pode-se destacar a *Pogostemon cablin*, popularmente conhecida como *patchouli*, que é uma planta arbustiva, perene, adaptada a condição climática quente e úmida. Originária das Filipinas é amplamente encontrada em muitos países do Sul da Ásia. Por armazenar óleos essenciais em suas folhas, apresenta grande valor comercial, sendo amplamente cultivada na Índia, Indonésia, Malásia, China, Singapura e América do Sul (BLANK et al., 2011).

Essa planta é bastante utilizada em práticas medicinais tradicionais na Índia e na China, e apresenta propriedades antifúngica, anti-helmíntica, antitripanossoma (BETTONI et al., 2010), inseticida (ALBUQUERQUE et al., 2013), antieméticas e antibacteriana (BLANK et al., 2011). No entanto, poucos estudos de atividade antifúngica contra cepas do gênero *Candida* foram realizados com o óleo essencial extraído das folhas de *Pogostemon cablin*.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, E.L.D.; LIMA, J. K. A.; SOUZA, F. H. O.; SILVA, I. M. A.; SANTOS, A. A.; ARAUJO, A. P. A.; BLANK, A. F.; LIMA, R. N.; ALVES, P. B.; BACCI, L. Insecticidal and repellence activity of the essential oil of *Pogostemon cablin* against urban plants species. **Acta Tropica**.v. 127, p. 181–186, 2013.
- ARAÚJO, J.C.L.V.; LIMA, E.O.; CEBALLOS, B.S.O.; FREIRA, K.R.L.; SOUZA, E.L. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microorganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Revista Patologia Tropical**, v. 33, p. 55-64, 2004.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BARBEDO, L.S; SGARBI, D. B. G. Candidíase. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, Rio de Janeiro, v. 22, n.01, p.22-38, 2010.
- BARBERÁN, J.; MENSA, J.; FARIÑAS, C.; LLINARES, P.; SERRANO, R.; MENÉNDEZ, R.; AGUSTÍ, C.; GOBERNADO, M.; AZANZA, J.; GARCÍA RODRÍGUEZ, J. Recommendations of antifungal treatment in patients with low grade immunosuppression. **Revista Espanhola de Quimioterapia**, v.21, n. 2, p. 127-142, 2008.
- BETTONI, M. M.; STORCK, R. C.; PEÑUELA, L. F.; MORAES, C. P. Propagação vegetativa de patchouli por estaquia. **Scientia Agraria**, v.11, p. 417-420, 2010.
- BLANK, A. F.; SANT`ANA, T. C. P.; SANTOS, P. S.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; PRATA, A. P. N.; JESUS, H. C. R.; ALVES, P. B. Chemical characterization of the essential oil from patchouli accessions harvested over four seasons. **Industrial Crops and Products**, v. 34, p. 831-837, 2011.
- BOCHNER, R.; FISZON, J.T.; ASSIS, M.A.; AVELAR, K.E.S. Problemas associados ao uso de plantas medicinais comercializadas no Mercado de Madureira, município do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n.3, p. 537-547, 2012.
- CALIXTO JB. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, p.37-39, 2003.
- CAVALEIRO, C.; PINTO, E.; GONÇALVES, M. J.; SALGUEIRO, L. R. Antifungal activity of Juniperus essential oils against dermatophyte, *Aspergillus* and *Candida strains*. **Journal of Applied Microbiology**, v.100, n. 6, p. 1333-1338, 2006.
- COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.
- FALCÃO, D.Q.; FERNANDES, S.O.B.; MENEZES, F.S. Triterpenos de *Hyptis fasciculata* Benth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, p.81-83, 2003.

GONÇALVES, L. A.; BARBOSA, L. C. A.; AZEVEDO, A. A.; CASALI, V. W. D. NASCIMENTO, E. A. Produção e composição do óleo essencial de Alfavaquinha (*Ocimum selloi* Benth.) em resposta a dois níveis de radiação solar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, n. 1, p. 8-14, 2003.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA, V. E.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v.25, p.429-438,2002.

MOREIRA, D.; SPOLIDÓRIO, D.M.; RODRIGUES, J.A.; BORIOLLO, M.F.; PEREIRA, C.V.; ROSA, E.A.; HÖFLING, J.F. *Candida* spp. biotypes in the oral cavity of school children from different socioeconomic categories in Piracicaba - SP, Brazil. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v.15, n.3, p. 187-195, 2011.

NAKAMURA, C. V.; ISHIDA, K.; FACCIN, L. C.; FILHO, B. P. D.; CORTEZ, D. A. G.; ROZENTAL, S.; SOUZA, W.; UEDA-NAKAMURA, T. *In vitro* activity of essential oil from *Ocimum gratissimum* L. against four *Candida* species. **Research in Microbiology**, v.155, n. 7, p. 579–586, 2004.

NASUTION, AI. Virulence Factor and Pathogenicity of *Candida albicans* in Oral Candidiasis. **World Journal of Dentistry**, v. 4, n.04, p. 267-271, 2013.

OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; VIEIRA, W. L.; FREIRE, K. R. L.; TRAJANO, V. N.; LIMA, I. O. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n. 1, p. 77-82, 2006.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistente public health problem. **Clinical Microbiology Review**, v 20, n. 1, p.133-63, 2007.

PINTO, E.; VALE-SILVA, L.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and *Dermatophyte* species. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 1454–1462, 2009.

PRABUSEENIVASAN, S.; JAYAKUMAR, M.; IGNACIMUTHU, S. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.6, n. 39, p. 1-8, 2006.

RIBEIRO, E.L.; GUIMARAES, R.I.; INÁCIO, M.C.C., et al. Aspectos das leveduras de *Candida* vinculadas as infecções nosocomiais. **NewsLab**, v.34, n.64, p. 15-20, 2004.

ROSSEL, G.; QUERO, C.; COLL, J.; GUERREIRO, A. Biorational insecticides in pest management, **Journal of Pest Science**, Berlin, v. 33, n. 02, p. 103-121, 2008.

ROSSI, T.; LOZOVY M. A.B.; SILVA R. V.; FERNANDES E. V.; GERALDINO T. H.; COSTA I. C.; SARIDAKIS, H.O.; WATANABE, M.A.E.; FELIPE, I. INTERAÇÕES entre *Candida albicans* e Hospedeiro. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 15-28, jan./jun. 2011.

SAAD, A.; FADLI, M.; BOUAZIZ, M.; BENHARREF, A.; MEZRIOUI, N.-E.; HASSANI, L. Anticandidal activity of the essential oils of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* and their synergism with amphotericin B and fluconazol. **Phytomedicine**, v. 17, n. 13, p. 1057–1060, 2010.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre, RS: Ed. da UFSC, 2004. Cap. 16, p. 403-434.

SILVA, F. M.; PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S. Evaluation of the antifungal potential of Brazilian Cerrado medicinal plants. **Mycoses**, v.52, n. 6, p. 511–517, 2009.

SCHULZE, J.; SONNENBORN, U. Yeasts in the gut: from commensals to infectious agents. **Deutsches Ärzteblatt international**, v.106, n.51-52, p.837–842, 2009.

TEMPONE, A. G.; SARTORELLI, P.; TEIXEIRA, D.; PRADO, F. O.; CALIXTO, I. A.; LORENZI, H.; MELHEM, M. S. Brazilian flora extracts as source of novel antileishmanial and antifungal compounds. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, p. 443-449, 2008.

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A. T. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, p. 1-26, 2012.

YAMADA, S.M.; TOMITA, Y.; YAMAGUCHI, T.; MATSUKI, T. Micafungin versus caspofungin in the treatment of *Candida glabrata* infection: a case report **Journal of Medical Case Report**, v.10,n.01, p. 316, 2016.

4. ARTIGO

BIOPROSPECÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE Pogostemon cablin (Lamiaceae) CONTRA CEPAS DE Candida tropicalis

Joyce Natielle Miranda Cavalcante¹; Daniele De Sousa Siqueira¹, José Lucas Soares Ferreira¹, Raquel Vieira Bezerra¹, Letícia Ataíde Delgado¹, Rebeca Cícera Mendes De Oliveira Silva¹, Rafael Cartaxo Figueira¹, Daniele De Figueredo Silva², Heloísa Mara Batista Fernandes De Oliveira³, Edeltrudes De Oliveira Lima², Abrahão Alves De Oliveira Filho^{1*}.

¹Academic Unit of Biological Sciences, Federal University of Campina Grande, Patos-PB, Brazil

²Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa-PB, Brazil

³Ana Bezerra University Hospital, Federal University Rio Grande do Norte, Santa Cruz-RN, Brazil

RESUMO

A levedura do gênero *Candida* é muito frequente na mucosa oral de indivíduos saudáveis. Porém, quando há quebra dos mecanismos de defesa do hospedeiro, esta levedura pode causar uma proliferação ou infecção da cavidade bucal. Os métodos convencionais para o tratamento de candidíase são baseados na utilização de agentes antifúngicos, porém, são observados vários inconvenientes quando da utilização dos mesmos, representados por toxicidade, interações antagônicas fármaco-fármaco, falta de eficácia fungicida, alto custo e surgimento de espécies resistentes, causado pela utilização frequente de alguns deles. Na busca por novas estratégias terapêuticas para a candidíase oral, estudos utilizando plantas medicinais estão sendo cada vez mais realizados. Esse trabalho procurou analisar a possível atividade antifúngica do óleo essencial de *Pogostemon cablin* contra cepas de *Candida tropicalis*. Para a determinação da CIM (Concentração Inibitória Mínima) do óleo essencial, foi realizada a técnica da microdiluição em caldo. Foi realizado controle de viabilidade das cepas ensaiadas, e também controle de sensibilidade destas cepas ao antimicrobiano anfotericina B. Diante dos resultados observou-se que para a cepa do tipo ATCC 13803 a CIM foi de 128 µg/ml, para a LM 64 foi de 32 µg/ml, no entanto, para as cepas LM 04 e 20 o óleo essencial apresentou uma CIM de >1024 µg/mL. Já para a Concentração Fungicida Mínima (CFM) os valores foram os mesmos que a CIM, respeitando suas respectivas cepas. Pode – se então concluir que o óleo essencial de *Pogostemon cablin* possui uma forte atividade antimicrobiana de caráter fungicida contra cepas de *Candida tropicalis*.

Palavras-chave: Fitoterapia, Candidíase, Farmacologia.

INTRODUÇÃO

A levedura do gênero *Candida* é muito frequente na mucosa oral de indivíduos saudáveis, sua taxa de prevalência varia de 20 a 70%. Contudo, quando há quebra dos mecanismos de defesa do hospedeiro, esta levedura pode causar uma proliferação ou infecção da cavidade bucal, observada principalmente na primeira infância, senescência e em pacientes imunocomprometidos¹.

A candidíase oral foi descrita como doença associada aos primeiros casos descritos na literatura de AIDS (síndrome da imunodeficiência adquirida), constituindo a infecção fúngica mais frequente em pacientes HIV positivos. Considera-se que até 90% dos indivíduos infectados pelo vírus HIV sofrerão pelo menos um episódio de candidíase orofaríngea².

Segundo Pfaller e Diekema (2007), mais de 17 espécies diferentes do gênero *Candida* são conhecidas como agentes etiológicos de infecções em humanos, entretanto mais de 90% das infecções invasivas são causadas por *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*³.

Os métodos convencionais para o tratamento de candidíase, superficial ou sistêmica, são baseados na utilização de agentes antifúngicos, como: nistatina, anfotericina B, miconazol, cetoconazol, entre outros. Porém, são observados vários inconvenientes quando da utilização dos mesmos, representados por toxicidade, interações antagônicas fármaco-fármaco, falta de eficácia fungicida, alto custo e surgimento de espécies resistentes, causados pela utilização frequente de alguns deles^{4,5}.

Além disso, apesar da introdução de novas drogas antifúngicas, elas ainda são em número limitado, evidenciando, portanto, uma grande demanda por novos agentes antifúngicos mais eficazes e menos tóxicos. Nesse contexto, desponta a utilização de metabólitos extraídos de plantas medicinais para este fim^{4,5}.

Cerca de 80% da população de países em desenvolvimento se utilizam das plantas medicinais como forma de tratamento de suas enfermidades. Este fato amplia a perspectiva para o desenvolvimento de pesquisas com plantas com a finalidade de propor alternativas que contribuam para qualificação e ampliação dos cuidados primários em saúde. O alto custo de medicamentos industrializados e a falta de acesso da população a serviços de saúde também impulsionam o crescente uso como métodos alternativos e complementares^{6,7}.

Na busca por novas estratégias terapêuticas para a candidíase oral, estudos utilizando óleos essenciais de plantas estão sendo cada vez mais realizados. Tais substâncias consistem em misturas complexas (formada principalmente por mono e sesquiterpenos alifáticos ou aromáticos) que se apresenta em diferentes proporções⁸.

Desta forma, com base nas informações sobre o potencial terapêutico dos óleos essenciais de plantas medicinais e a importância do combate às infecções causadas por leveduras do gênero *Candida*, esse trabalho procurou avaliar a possível atividade antifúngica do óleo essencial de *Pogostemon cablin* (Lamiaceae).

METODOLOGIA

Ensaio *in vitro*

Substância-teste

O produto submetido ao ensaio biológico foi codificado por:

(OE) Óleo essencial - *Pogostemon cablin*

O mesmo foi devidamente solubilizado em tween 80 a 0,02%, a Dimetil-sulfóxido (DMSO) numa proporção de até 0,5% e completada com água destilada esterilizada (q.s.p. 6 mL) para obter uma emulsão na concentração de 1024 µg/mL^{9,10}.

Espécies Fúngicas

Para o ensaio de atividade biológica do OE, foi utilizada a seguintes leveduras do gênero *Candida*:

- *Candida tropicalis* (C. t. ATCC 13803, C. t. LM – 04; C. t. LM – 20 e C. t. LM – 64);

Estas pertencentes e gentilmente cedidas pela MICOTECA do Laboratório de Micologia, Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF), Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba. Todas as cepas foram mantidas em ASD à temperatura de 4 °C. Foram utilizados para os ensaios, repiques de 24-48 horas em ASD, incubados a 35 ± 2 °C.

Inóculo

Para preparação do inóculo, colônias obtidas de culturas das cepas de *Candida* spp. mantidas em ASD, foram suspensas em solução de NaCl 0,85% estéril e ajustadas de acordo com o padrão 0,5

de McFarland para primeiramente obter um inóculo de 10^6 UFC/mL e em seguida diluída em solução salina numa proporção de 1:9, para enfim resultar numa suspensão fúngica contendo 10^5 UFC/mL que foi utilizada nos ensaios ^{11,12}.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os ensaios de atividade antifúngica foram realizados conforme os protocolos de ^{13,14} e ¹⁵. A determinação da CIM das substâncias sobre cepas de *Candida* foram realizadas através da técnica da microdiluição em caldo em placa para cultura de células (TPP/ SWITZERLAND/EUROPA) contendo 96 poços. Inicialmente, foram distribuídos 100 μ L de RPMI 1640 duplamente concentrados nos orifícios das placas de microdiluição. Em seguida, 100 μ L da emulsão dos produtos teste duplamente concentrados, foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. E por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foram obtidas concentrações de 1024 μ g/mL até 4 μ g/mL. Por fim, foram adicionados 10 μ L dos inóculos de *Candida* spp. nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se a uma cepa fúngica, especificamente. Paralelamente, foi realizado o controle do inóculo (RPMI 1640 + leveduras); e controle droga padrão (RPMI 1640+ inóculo+ anfotericina B 100 μ g). As placas preparadas e assepticamente fechadas foram submetidas à incubação numa temperatura de 35 ± 2 °C por 24 - 48 horas. A CIM foi definida como a menor concentração do produto, capaz de produzir inibição visível sobre o crescimento fúngico verificado nos orifícios, quando em comparação com seus controles. O resultado foi expresso pela média aritmética das CIM's obtidas no ensaio realizado em duplicata. A atividade antifúngica dos produtos foi interpretada e considerada como ativa ou inativa, conforme os seguintes critérios: 50-500 μ g/mL= forte/ótima atividade; 600-1500 μ g/mL= moderada atividade; > acima de 1500 μ g/mL=fraca atividade ou produto inativo ¹⁶.

Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Após leitura da CIM, alíquotas de 10 μ L do sobrenadante das cavidades onde foi observada completa inibição do crescimento fúngico (CIM, CIM x 2 e CIM x 4) nas placas de microdiluição, foram subcultivadas em 100 μ L de RPMI 1640 contidos em novas placas. Posteriormente, as mesmas devidamente preparadas, foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24-48 horas. A CFM foi considerada como a menor concentração em que não houve crescimento de leveduras no meio de cultura. Os ensaios foram realizados em duplicata e o resultado expresso pela média aritmética das CFM's obtidas nos dois ensaios ¹⁷.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) em meio líquido foi testada e determinada para o óleo essencial de *Pogostemon cablin* nas diferentes concentrações sugeridas na metodologia e determinada pela menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento fúngico, conforme apresentado na tabela. Observou-se que os resultados para o óleo testado variaram entre 1024 e 32 µg/mL.

A CIM₅₀ é dita como a menor concentração capaz de inibir 50% das cepas durante o experimento; seguindo a premissa, observa-se que a CIM₅₀ para *Candida tropicalis* foi de 128 µg/mL (Tabela 1).

Já a Concentração Fungicida Mínima (CFM) foi determinada a partir da menor concentração do óleo que decorreu da inibição visível do crescimento do micro-organismo. Os valores obtidos foram os mesmos que o da CIM, variando entre 1024 e 32 µg/mL.

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) em µg/mL do óleo essencial de *Pogostemon cablin* contra diferentes cepas de *Candida tropicalis*.

Microorganismo	<i>Pogostemon cablin</i>	
	CIM	CFM
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803	128	128
<i>Candida tropicalis</i> LM 04	>1024	>1024
<i>Candida tropicalis</i> LM 20	>1024	>1024
<i>Candida tropicalis</i> LM 64	32	32

Fonte: Próprio autor

As plantas medicinais são importantes por fornecerem matéria-prima para a síntese de drogas, além de serem utilizadas como agentes terapêuticos alternativos. O emprego das plantas é supervalorizado no uso tradicional com base nos seus benefícios medicinais. Dessa forma, torna-se imprescindível o conhecimento sobre a dose e a parte empregada da planta, além de suas propriedades terapêuticas, pois existem aquelas que são altamente tóxicas, mesmo em pequenas doses¹⁸.

As espécies de *Candida* fazem parte da microbiota bucal de aproximadamente 50% da população. Entretanto, sob determinadas condições, podem comportar-se como patógenos oportunistas,

produzindo infecções que vão desde lesões mucosas superficiais até disseminações sistêmicas graves e invasivas, potencialmente fatais em pacientes imunocomprometidos. Além de diversas formas de candidose, essas leveduras podem estar envolvidas em lesões endodônticas persistentes e doenças periodontais. A espécie mais isolada dessas infecções é *C. albicans*, seguida das espécies *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*.¹⁹.

O patchouli, *Pogostemon cablin Benth.* (Lamiaceae), produz um óleo essencial extraído por destilação a vapor de suas folhas secas, que possui diversas propriedades, dentre elas aromaterápicas, atividade antibacteriana, antifúngica, antioxidante, inseticida, e repelente contra insetos²⁰.

Sartoratto et al. (2004) sugerem que uma atividade antimicrobiana é classificada como forte quando, para óleos essenciais, possuem CIM de até 500 µg/mL, moderada para CIM de 600 a 1500 µg/mL e fraca para CIM acima de 1500 µg/mL¹⁶.

Sendo assim, de acordo com o resultado do óleo, o *Pogostemon cablin* pode ser considerado um forte inibidor frente às cepas de *Candida tropicalis*, uma vez que apresentou uma CIM₅₀ (Concentração Inibitória Mínima capaz de inibir o crescimento de 50% das cepas) de 128 µg/mL.

De acordo com Hafidh et al. (2011), para um composto ser considerado fungicida ou fungioestático de acordo com a Concentração Fungicida Mínima (CFM) deve ser igual ou duas vezes mais que o CIM ou o CFM deve ser maior que duas vezes o CIM, respectivamente. Analisando o resultado do CFM pode-se ver que o *Pogostemon cablin* possui atividade fungicida, já que o CIM foi igual ao CFM²¹.

Os resultados encontrados nesta pesquisa reforçam os dados encontrados por Das et al. (2013) e Wang et al. (2012) estudos demonstrando o potencial antifúngico de *P. cablin* contra cepas de *Candida*^{22,23}.

CONCLUSÃO

Em vista dos resultados obtidos, pôde-se observar que o óleo essencial de *Pogostemon cablin* testado apresentou resultados relevantes. Diante disso, o produto natural pode ser considerado como promissor contra as cepas de *Candida tropicalis*, no entanto fazem-se necessários estudos mais aprofundados para elucidação de mecanismos e padrões de eficiência e eficácia.

AGRADECIMENTOS

Obrigada à Universidade Federal de Campina Grande pelo suporte e assistência.

REFERÊNCIAS

1. De rossi, Tatiane, Lozovoy, Marcell Alysso Batista Silva, Valeriano da et al. Interações entre *Candida albicans* e hospedeiro. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, v. 32, n. 1, p. 15-28, 2011.
2. Barbedo, Isgarbi, d b g. Candidíase. *Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis*, v. 22, n. 01, p. 22-38, 2010.
3. Pfaller, m adiekema, d j. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistente public health problem. *Clinical Microbiology Review*, v. 20, n. 1, p. 133-63, 2007.
4. Pinto, e., vale-silva, l.cavaleiro, c. 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.
5. Yamada s, Tomita y, Yamaguchi t, Matsuki, t. Micafungin versus caspofungin in the treatment of *Candida glabrata* infection: a case report. *Journal of Medical Case Report*. 2016;10(01):316.
6. Calixto, j b. Biodiversidade como fonte de medicamentos. *Ciência e Cultura*, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.
7. Bochner, r., fizon, j.t.assis, m.a. et al. Problemas associados ao uso de plantas medicinais comercializadas no Mercado de Madureira, município do Rio de Janeiro, Brasil. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-05722012000300017&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 8 ago. 2018.
8. Rossel, G.; Quero, C.; Coll, J.; Guerreiro, A. Biorational insecticides in pest management, *Journal of Pest Science*, Berlin, v. 33, n. 02, p. 103-121, 2008.
9. Nascimento, paula f.c., nascimento, analuiza c.rodrigues, Carolina S. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2007000100020>. Acesso em: 8 ago. 2018.
10. Pereira, fillipe de Oliveira, Mendes, Juliana Mouralima, Igara Oliveira 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, 2014.
11. Koneman, e. W; Allen, s. D.; Janda, w. M.; Schreckenberger, p. C.; win, w. C. J. *Diagnóstico Microbiológico*. 6 ed. São Paulo: Médica e Científica Ltda, 2008. p. 1565.
12. Ostrosky, e. A.; Mizumoto, m. K.; Lima, m.e.l.; Kaneko, t. M.; Nishikawa, s. O.; Freitas, b. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana de determinação de concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.
13. Cleeland R, Squires E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections. 1st ed. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. New York: Willians & Wilkins; 1991. p. 739-788.
14. Hadacek F, Greger H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical Analysis*. 2000;11(3):137-147.
15. Nccls/clsi. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard. Document M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
16. Sartoratto A, Machado A, Delarmelina C, Figueira G, Duarte M, Rehder V. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2004;35(4):275- 280.
17. Ncube N.S., Afolayan A.J., Okoh A.I.. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural

compounds of plant origin: current methods and future trends. *African Journal of Biotechnology*.2008.

7(12):1797-1806.

18. Zhan, jzhou, p a. A simplified method to evaluate the acute toxicity of ricin and ricius agglutinin.

Toxicology, v. 186, n. 1-2, p. 119-123, 2003.

19. Repentigny l, Aumont f, Bernard k, Belhumeur p. Characterization of binding of *Candida albicans* to small intestinal mucin and its role in adherence to mucosal epithelial cells. *Infect Immun*. 2000;68:3172-9

20. Khare, c. P. *Indian medicinal plants*. New York: Springer, 2007.

21. Hafidh r, abdulmir a, vern l, bakar f, abas f, jahanshiri f et al. Inhibition of growth of highly resistant

bacterial and fungal pathogens by a natural product. *Open Microbiol J*. 2011;5:96-106.

22. Das P, Dutta S, Begum J, NuralAnwar M. Antibacterial and Antifungal Activity Analysis of Essential Oil of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. *Bangladesh J Microbiol*, 2013: 30 (1&2):07-10.

23. Wang G ,Deng J, Ma Y, Shi M, Li B. Mechanisms, clinically curative effects, and antifungal activities of cinnamon oil and pogostemon oil complex against three species of *Candida*. *J Traditional Chinese Medicine*. 2012: 32(1):1-2.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo possibilitou uma análise *in vitro* do Óleo essencial de *Pogostemon cablin* contra cepas de *Candida tropicalis*. Verificou-se que essa substância apresentou uma forte atividade de inibição contra as cepas, já que sua CIM₅₀ foi de 128 µg/mL. A partir do resultado da CFM₅₀, que também foi de 128 µg/mL, podemos classificar o óleo como fungicida. Toda via, fazem-se necessárias novas pesquisas envolvendo o mesmo, para aprofundamento dos padrões de eficiência e eficácia farmacológica.

6. ANEXO

FORMATO DE MANUSCRITO

Todo o manuscrito deve estar em MS WORD.

- **Idioma:** inglês
- **Espaço:** 1,5
- **Tamanho do papel:** A4 (8,5 "X11")
- **Margens:** 1 polegada (todos os lados)

ORGANIZAÇÃO DO MANUSCRITO

Deve ser organizado na seguinte ordem:

	Conteúdo		Texto	
	Seqüência	Tipo de fonte	Tamanho da fonte	Padronizar
1	Título	Times New Roman	14	Negrito
2	Nome do autor	Times New Roman	12	Normal
3	Afiliação	Times New Roman	10	Normal
4	Abstrato	Times New Roman	12	Normal
5	Palavras-chave	Times New Roman	12	Normal
6	Introdução	Times New Roman	12	Normal
7	Materiais e métodos	Times New Roman	12	Normal
8	Resultado	Times New Roman	12	Normal
9	Discussão	Times New Roman	12	Normal
10	Conclusão	Times New Roman	12	Normal
11	Reconhecimento	Times New Roman	12	Normal
12	Referência	Algarismos arábicos	12	Normal

Cabeçalhos	Times New Roman	12	Negrito
Subtítulos	Times New Roman	12	Negrito
Texto de corpo	Times New Roman	12	Normal

Título

O título deve ser breve, abrangente e descritivo.

Autoria

Cada autor deve fornecer seu nome completo, incluindo seu primeiro nome e sobrenome, seguido de seu endereço. O Autor Correspondente do manuscrito deve ser mencionado a marca estelar em sobrescrito e deve ser mencionada a afiliação dos autores. Além disso, o autor correspondente deve incluir telefone, fax e endereço de e-mail no canto inferior esquerdo da página de título.

Resumo Deve começar em uma nova página após a página de título para distingui-la da Introdução. Os resumos devem refletir brevemente todos os aspectos do estudo. O resumo não deve exceder 250 palavras. Artigos de revisão, trabalhos de pesquisa e comunicações curtas também devem ter um resumo.

Palavras-chave

Abaixo do resumo mencione 4-6 palavras-chave adequadas para indexação. Esses termos estarão no final do resumo. Se possível, as palavras-chave devem ser selecionadas do Index Medicus ou do Excerpta Medica Index.

Introdução

Deve começar em uma nova página e indicar claramente Objetivo, Revisão de Literatura e Objetivo da pesquisa.

Materiais e Métodos

Esta seção deve descrever os materiais e métodos usados no estudo, como ano, local e outros detalhes relevantes. O método estatístico e o nível de significância escolhido devem ser indicados. Inclua detalhes de aprovação ética neste segmento (se houver).

Resultado e Discussão

A seção deve focar no cumprimento dos objetivos mencionados na parte de introdução. Deve conter uma revisão crítica dos resultados do estudo.

Conclusão

Esta seção deve conter apenas resultados significativos da pesquisa.

Reconhecimento

Todos os agradecimentos devem ser digitados em um parágrafo antes da seção de referência (Todas as pessoas que fizeram contribuições significativas para o trabalho de pesquisa devem ser incluídas no Reconhecimento).

Referência

O Estilo Vancouver é o estilo de citação usado por revistas científicas. Ele saiu de uma reunião de editores de revistas médicas em 1978, realizada em Vancouver, BC, e é mantido pelo Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas (ICMJE).

Autor de **livros** iniciais de sobrenome. Título: subtítulo. Edição (se não for a primeira). Lugar da publicação: Publicador: Ano.

Exemplo:

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Farmacologia. 5ª ed. Edimburgo: Churchill Livingstone; 2003.

Revistas

Autor Sobrenome Iniciais. Título do artigo Título do periódico, abreviado. Data de Publicação: Número do Volume (Número do Problema): Números de Página.

Exemplo:

John JC Inibidores da ECA e AINEs. Med J Euro. 2010; 777: 181–195.

Websites

Autor iniciais do sobrenome (se disponível). Título do site [Internet]. Lugar de publicação: Publisher; Data da Primeira Publicação [Data da última atualização; data citada]. Disponível em: URL

Exemplo:

George Samsung, Rosy Chris. HIV. MediNet. 15/1/2004
Disponível em: <http://www.health.com/article.htm>

Se o autor não é conhecido:

Título da página. Título do site. Última atualização ou data de direitos autorais. URL (data de acesso).

Figuras, Imagens e Tabelas

Figuras, imagens e tabelas devem ser colocadas em local apropriado no manuscrito.

Submissão do manuscrito

Todos os manuscritos devem ser submetidos pelo sistema de submissão on-line ou por e-mail para editor@humanjournals.com e editor.in.chief.international@gmail.com como anexo.