

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
BACHARELADO EM ODONTOLOGIA**

**RAFAEL CARTAXO FILGUEIRA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FARMACOLÓGICO DO ÓLEO ESSENCIAL  
DE *Rhaphiodon echinus* Ness Mart. Schauer (*Lamiaceae*)**

**PATOS/PB  
2019**

**RAFAEL CARTAXO FILGUEIRA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FARMACOLÓGICO DO ÓLEO ESSENCIAL  
DE *Rhaphiodon echinus* Ness Mart. Schauer (*Lamiaceae*)**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado a 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

F478a

Filgueira, Rafael Cartaxo

**Avaliação do potencial farmacológico do óleo essencial de *Rhaphiodon echinus* Ness Mart. Schauer (*Lamiaceae*) / Rafael Cartaxo Filgueira. – Patos, 2019.**

50f.

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. Bioquímica. 2. Fitoterapia. 3. Microbiologia. 4. Odontologia.

I. Título.

CDU 616-085:619

RAFAEL CARTAXO FILGUEIRA

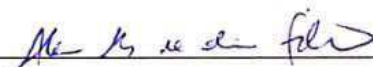
**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FARMACOLÓGICO DO ÓLEO ESSENCIAL  
DE *Rhaphiodon echinus* Ness Mart. Schauer (*Lamiaceae*)**

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.

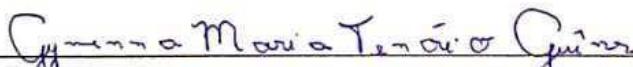
Orientador: Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho

Aprovado em 29/05/19

**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

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais, **José Filgueira** e **Masilsa Cartaxo**, que nunca mediram esforços para que eu pudesse me dedicar aos estudos e por todo amor e carinho ao longo dos anos.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus por ter me dado forças e me guiado para atravessar todos os obstáculos que apareceram durante estes anos de curso.

Aos meus pais por esta vitória alcançada, por todo carinho, apoio e cuidado que vocês tiveram comigo durante essa caminhada.

A minha irmã Clara, por todo companheirismo e amor e por me aturar todo tempo.

A Vanessa Gonçalves por todo apoio durante estes 5 anos, eu não teria sobrevivido a Patos sem você por perto.

A meus amigos e companheiros de clínica: Wallid Carlos, Danilo Vieira, Marconi Júnior e Lindon Jhonson pelos anos de parceria e pelas risadas nas clínicas de todo dia.

A Guilherme Cartaxo, Guilherme Bayma, Ailton Pereira e Jorge Luiz por todo apoio e amizade, mesmo com a distância.

A toda minha família que apoiou a mim e a meus pais a entrar em um curso longe de casa

Aos professores pelos conhecimentos e lições passados durante o curso.

Aos funcionários presentes no nosso dia a dia da universidade.

Às professoras Angélica e Gymenna pelos ensinamentos e por estarem presentes na minha banca.

Aos membros da LAFBIM, que puderam de alguma forma contribuir para que este trabalho fosse realizado.

Por ultimo e não menos importante ao professor Abrahão, que foi o primeiro professor a me estender a mão e dar uma oportunidade além da graduação, por toda sua paciência, profissionalismo e cuidado com todos seus orientandos, a todos os conhecimentos e conselhos passados o meu muito obrigado.

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FARMACOLÓGICO DO ÓLEO ESSENCIAL  
DE *Rhaphiodon echinus* Ness Mart. Schauer (Lamiaceae)**

**RESUMO**

Os óleos essenciais de plantas, bem como os compostos derivados destes óleos como os terpenos, têm atraído cada vez mais interesse por causa das suas propriedades antioxidantes e antifúngicas. Um óleo essencial pouco estudado é o extraído da planta *Rhaphiodon echinus*, uma espécie vegetal brasileira, que pertence à família Lamiaceae e conhecida popularmente como “Betonica”. Como objetivo principal procurou-se avaliar as atividades farmacológicas do óleo essencial de *Rhaphiodon echinus* Ness Mart. Schauer (Lamiaceae), bem dos principais fitoconstituintes deste óleo. Para a avaliação do potencial antioxidante, utilizou-se tanto técnicas *in silico*, através do programa PASS online<sup>®</sup>, análise farmacológica *in silico* dos principais fitoconstituintes do óleo demonstrou uma ampla lista de atividades, tais como, anti-inflamatória e antineoplásica, que estão diretamente relacionadas com atividade antioxidante, quanto *in vitro*, por meio de testes com o íon ferroso (Fe<sup>2+</sup>). Todos os testes *in vitro* foram feitos em triplicata. Para analisar a atividade antifúngica do óleo essencial de *Rhaphiodon echinus* sobre cepas de *Candida albicans*, *tropicalis* e *krusei*, por meio da investigação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo. Os resultados dos testes *in silico* mostraram o potencial antioxidante dos principais compostos analisados, nos *in vitro* observou-se uma atividade antioxidante satisfatória do óleo essencial contra o íon ferroso. Em relação à atividade antifúngica CIM<sub>50%</sub> para *Candida albicans* e *Candida tropicalis* foi de 512 µg/mL. A CIM<sub>50%</sub> para *Candida krusei* foi de 256 µg/mL. Assim pôde-se concluir que o óleo essencial de *Rhaphiodon echinus* Ness Mart. Schauer é portador de um potencial antioxidante e antifúngico, sendo uma substância promissora para os tratamentos odontológicos.

**Palavras-chave:** Bioquímica, Fitoterapia, Microbiologia, Odontologia.

## ABSTRACT

The essential oils of plants, as well as their derivatives, such as terpenes, have attracted more and more interest because of their antioxidant properties. An essential oil rarely studied and extracted from the *Rhaphiodon echinus* plant, a Brazilian plant species, which belongs to the Lamiaceae family and is popularly known as "Betonica". The main objective was to evaluate the pharmacological activities of the essential oil of *Rhaphiodon echinus* Ness Mart. Schauer (Lamiaceae), as well as the main phytochemicals of this oil. For the evaluation of the antioxidant potential, both in silico techniques were used, through the online PASS program, pharmacological analysis of the major phytochemicals of the oil showed a broad list of activities, such as anti-inflammatory and antineoplastic, which are directly related to antioxidant activity, and in vitro, by means of tests with the ferrous ion ( $Fe^{2+}$ ). All in vitro tests were done in triplicate. To analyze the antifungal activity of *Rhaphiodon echinus* essential oil on strains of *Candida albicans*, *tropicalis* and *krusei*, by means of the investigation of Minimal Inhibitory Concentration (MIC) using in vitro assays the broth microdilution technique was used. The results of the in silico tests showed the antioxidant potential of the main compounds analyzed, in vitro a satisfactory antioxidant activity of the essential oils against the ferrous ion and CIM50% for *Candida albicans* and *Candida tropicalis* is 512  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . CIM50% for *Candida krusei* is 256  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . Thus it could be concluded that the essential oil of *Rhaphiodon echinus* Ness Mart. Schauer is a carrier of antioxidant and antifungal potential and is a promising substance for dental treatments.

**Keywords:** Biochemistry, Phytotherapy, Microbiology, Dentistry.



## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1:</b> Atividades farmacológicas teóricas do espatulenol de interesse, de acordo com o programa <i>PASS Online</i> <sup>®</sup> .	29
<b>TABELA 2:</b> Atividades farmacológicas teóricas do aromadendreno de interesse, de acordo com o programa <i>PASS Online</i> <sup>®</sup> .	29
<b>TABELA 3:</b> Atividades farmacológicas teóricas do cadin-4-en-10-ol de interesse, de acordo com o programa <i>PASS Online</i> <sup>®</sup> .	29
<b>TABELA 4:</b> Atividades farmacológicas teóricas do $\beta$ -bourboneno de interesse, de acordo com o programa <i>PASS Online</i> <sup>®</sup> .	30
<b>TABELA 5.</b> Concentração Inibitória Mínima (CIM) em $\mu\text{g/mL}$ do óleo essencial de <i>Rhaphiodon echinus</i> contra cepas de <i>Candida albicans</i> .	39
<b>TABELA 6.</b> Concentração Inibitória Mínima (CIM) em $\mu\text{g/mL}$ do óleo essencial de <i>Rhaphiodon echinus</i> contra cepas de <i>Candida tropicalis</i> .	39
<b>TABELA 7.</b> Concentração Inibitória Mínima (CIM) em $\mu\text{g/mL}$ do óleo essencial de <i>Rhaphiodon echinus</i> contra cepas de <i>Candida krusei</i> .	39

## LISTA DE GRÁFICO

**Gráfico 1:** Porcentagem de inibição do íon ferroso pelo óleo essencial de *Rhaphiodon echinus* Ness Mart. Schauer (Lamiaceae). \* $p < 0,05$  concentrações do óleo essencial *versus* controle negativo. 28

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RL radicais livres

EROs espécies reativas de oxigênio

ERNs espécies reativas de nitrogênio

CG/EM cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

FeCl<sub>2</sub> cloreto ferroso

µg micrograma

mL mililitro

Pa probabilidade de ser ativo

Pi probabilidade de ser inativo

Nm Nanômetro

ASD ágar Sabouraud dextrose

CSD caldo Sabouraud dextrose

DMSO dimetilsulfóxido

CIM concentração inibitória mínima

*C. albicans* *Cândida albicans*

*C. tropicalis* *Cândida tropicalis*

*C. krusei* *Cândida krusei*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>14</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>18</b>
<b>3. ARTIGO CIENTÍFICOS.....</b>	<b>22</b>
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>42</b>
<b>ANEXO 1.....</b>	<b>43</b>
<b>ANEXO 2.....</b>	<b>48</b>

## 1.INTRODUÇÃO

A oxidação é um processo necessário para a manutenção da vida, assim a existência de radicais livres no organismo é um processo natural, no qual estes são fundamentais para diversas funções como na produção de energia e na regulação do crescimento celular (ATOUI et al., 2005; BARREIROS et al., 2006; SANTOS et al., 2016).

No entanto, o excesso de oxidação biológica pode causar danos ao organismo devido a produção exacerbada de radicais livres. Muitos estudos apresentaram evidências de que os radicais livres e outros oxidantes em excesso são responsáveis pelo envelhecimento e pelas doenças degenerativas associadas a ele, como as doenças cardiovasculares e as doenças da cavidade bucal, como a doença periodontal e doenças como a mucosite oral (SANTOS et al., 2016; SOUSA et al., 2007).

Nesse contexto surgem os agentes antioxidantes, como os óleos essenciais extraídos de plantas medicinais, que por sua vez tem a capacidade de proteger as moléculas dos danos causados por estes radicais e servem ainda como agentes quimioprotetores, inibindo a geração de radicais livres e tendo um importante papel na neutralização de danos oxidativos causados por esses radicais (ANTHONY et al., 2012; HORVATHOVA et al, 2014).

Alguns trabalhos têm demonstrado a associação entre antioxidantes e o estado de saúde bucal. De acordo com o estudo feito por Cuba et al., (2015), o estresse oxidativo é considerado um dos fatores preponderantes para que sejam ativados eventos responsáveis pela mucosite oral e uma das maneiras de evitar a formação exagerada desses radicais pode-se abrir mão da utilização de agentes antioxidantes como as vitaminas E e C.

Em pacientes com mucosite oral mais severa, dependendo das doses de radiação e da resposta do organismo do paciente, o tecido conjuntivo exposto predispõe posterior colonização por fungos do tipo *Cândida albicans*, agravando a sintomatologia, sendo necessária a intervenção antifúngica (CHIAPPELLI, 2005).

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 *Cândida* frente à ação de alguns antifúngicos convencionais (ARAÚJO et al., 2004; VANDEPUTTE et al., 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 et al., 2009).

Os óleos essenciais são compostos por mesclas de substâncias voláteis originados do metabolismo secundário das plantas, são uma fonte farta de compostos biologicamente ativos (GONÇALVES et al., 2003). Biologicamente, são produzidos como mecanismo de defesa ou para atração de polinizadores (SIANI et al., 2000). Os óleos essenciais têm sido largamente utilizados pelas indústrias farmacêuticas, sanitárias, cosmética, agrícolas e de alimentos devido às suas propriedades medicinais (BAKKALI et al., 2008).

Um exemplo de óleo essencial pouco relatado na literatura científica com relação as suas propriedades farmacológicas é o óleo extraído da planta *Rhaphiodon echinus*, uma espécie vegetal brasileira, pertencente a família Lamiaceae e conhecida popularmente como “Betonica” e “flor-de-urubu”. Na medicina popular, suas folhas são utilizadas para diversos fins terapêuticos como por exemplo: tratamento da tosse, inflamação na cavidade oral e infecções no trato genitourinário. (ALBUQUERQUE et al, 2007; MENEZES et al., 1998).

Desta forma, com base nas informações sobre o potencial terapêutico dos óleos essenciais e a importância do combate da formação dos radicais livres para a saúde bucal, bem como das infecções fúngicas, esse trabalho procura avaliar a possível atividade antioxidante e antifúngica do óleo essencial de *Rhaphiodon echinus* Ness Mart. Schauer (Lamiaceae).

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

A oxidação é um processo que ocorre naturalmente no organismo, quando as células utilizam oxigênio para produzir energia. Por meio da respiração, 2 a 5% de oxigênio que entram no corpo, acabam reagindo com compostos e produzem moléculas altamente instáveis, conhecidas por radicais livres (RL). Muitos desses processos formam RL com efeitos benéficos e importantes nas reações bioquímicas e fisiológicas do corpo humano. O problema começa quando a quantidade de RL está muito elevada, excedendo as defesas do organismo, condição conhecida por estresse oxidativo (COSTA et al., 2012; SIZER; WHITNEY, 2003).

A formação de RL no organismo é muito simples, pois estes são moléculas com um ou mais elétrons não pareados. Dessa forma, um elétron sem par é instável e para recuperar sua estabilidade, quando encontra um composto estável, mas vulnerável, ele acaba roubando um elétron. Com a perda de um elétron, a molécula anteriormente estável, torna-se um radical livre e rouba um elétron de outra molécula. A formação dos radicais livres inicia e se espalha rapidamente, em um cenário de reações de oxido-redução, isto é, ou cedem o elétron solitário, oxidando-se, ou recebem outro, reduzindo-se (CHOI et al., 2002; DUARTE et al., 2016).

Dentre os radicais livres RL mais comuns, encontram-se as espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs), que induzem danos oxidativos a várias biomoléculas presentes nas células humanas, tais como, os lipídios, as proteínas e os ácidos nucleicos (FREITAS et al., 2014).

A liberação dos radicais livres reativos a oxigênio em excesso, tem como consequência o estresse oxidativo, que por sua vez pode ser considerado um dos fatores preponderantes para que sejam ativados eventos responsáveis pelo desenvolvimento da mucosite oral. Para evitar essa formação exagerada de radicais livres são empregados os agentes antioxidantes como a vitamina E, vitamina C e diversos compostos polifenólicos (CUBA et al., 2015).

A produção de EROs e ERNs nos seres vivos pode ser controlada por compostos antioxidantes de origem endógena e/ou provenientes da dieta alimentar, como tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), polifenóis, selênio e carotenoides (SANTOS et al., 2016).

Segundo Sousa et al. (2007) denominam-se antioxidantes as substâncias que presentes em concentrações baixas, comparadas ao substrato oxidável, retardam

significativamente ou inibem a oxidação do substrato e podem ser de origem sintética ou natural (ATOUI et al., 2005; BARREIROS et al., 2006).

Os antioxidantes sintéticos são adquiridos pela suplementação alimentar e em adição a alimentos, prática comum na indústria alimentícia (PITARO et al, 2009). Já os antioxidantes naturais, adquiridos na dieta, têm como principal fonte as vitaminas (A, C e E), compostos fenólicos e carotenoides, contidos principalmente nas frutas e vegetais (PEREIRA et al., 2009; RATNAM et al., 2006). Desta forma, a busca por alimentos ou plantas medicinais aromáticas que tenham estas propriedades tem aumentado significativamente, uma vez que os seus compostos fenólicos podem promover proteção ao organismo e frequentemente apresentam atividade antioxidante.

Os óleos essenciais 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; SIQUI et al., 2000).

Óleos essenciais, assim como as plantas aromáticas, têm sido utilizados desde os tempos antigos. Entretanto, foi somente no século XX que os óleos essenciais começaram a ser utilizados no tratamento de doenças (ROMERO; ROMERO, 2014). Várias atividades biológicas/farmacológicas foram comprovadas para diferentes óleos essenciais, tais como anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana. A maioria dessas atividades biológicas/farmacológicas são atribuídas aos terpenoides constituintes dos óleos essenciais (BAKKALI et al., 2008; EDRIS, 2006).

Diversos estudos na literatura a respeito de óleos essenciais demonstram diversos potenciais de atividades farmacológicas, dentre elas a atividade antifúngica é uma que se destaca e dentre as espécies de plantas que fornecem os óleos, destacam-se *Cymbopogon martinii*, *Ocimum basilicum* e *Thymus vulgaris* apresentam atividade frente a espécies bacterianas e fúngicas, incluindo a *C. albicans* (Duarte et al., 2005; Almeida et al., 2010; Cavalcanti et al., 2011). Também foi relatada ação antifúngica em espécies como *Cynnamomum zeylanicum*, *Eucaliptus citriodora* e *Eugenia uniflora* (Araújo et al., 2004).



A microbiota residente da boca é bastante diversificada, com mais de 700 espécies de micro-organismos identificadas, das quais muitas ainda não foram formalmente descritas. Nessa vasta e complexa ecologia microbiana da cavidade bucal humana, encontram-se, pelo menos, vinte gêneros e, aproximadamente, noventa espécies de leveduras isoladas e classificadas; dentre estas, oito espécies do gênero *Candida* foram consideradas patogênicas oportunistas causadoras de candidíase oral: *Candida albicans*, *Candida guilliermondii*, *Candida kefyr*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida viswanathii* e *Candida glabrata* (MCLNTYRE, 2001; YUHONG et al., 2015).

*Candida tropicalis* é uma das cepas mais frequentemente encontradas em hospitais brasileiros, sendo a segunda mais comumente encontradas de maneira geral. Sendo uma infecção mais recorrente em pacientes adultos, idosos e com sistema imunológico debilitado (NUCCI; COLOMBO,2007).

Com o início da utilização dos azóis, que possuem uma baixa incidência de efeitos colaterais e uma boa biodisponibilidade oral, deu-se início a uma nova fase no tratamento de infecções fúngicas. Porém com o decorrer de um certo tempo de uso notou-se que os tratamentos utilizando azóis estavam fracassando. Estudos indicaram que esse fracasso é proveniente à resistência que as cepas de *cândida* adquiriram aos medicamentos antifúngicos (NUCCI; COLOMBO,2002). Tornando-se assim necessária a busca de novas alternativas terapêuticas, como a busca de compostos vegetais com propriedades antifúngicas.

Uma importante família do reino vegetal é a Lamiaceae, que compreende cerca de 7000 espécies de plantas, que na sua maioria são produtoras de óleos essenciais (FALCÃO et al., 2003). Dentre estas espécies desta família pode-se destacar a *Raphiodon echinus*, que é comum no leste do Brasil e típica da "caatinga" (vegetação semi-árida). É uma erva com folhas aromáticas com flores roxas brilhantes, encontrada nos estados da Bahia, Pernambuco, Paraíba, Ceará, e Minas Gerais (SOUZA; RODRIGUES, 2012).

Em um estudo fitoquímico, Menezes e Kaplan (2006) identificaram a presença de triterpenos pentacíclicos ácidos presentes no óleo essencial de *Raphiodon echinus*, tais como o ácido betulínico, ácido oleanólico, ácido usólico, ácido mircomérico e ácido siaresinólico.

A infusão das folhas de *Raphiodon echinus* é utilizada na medicina popular brasileira para o tratamento de inflamação, tosses e doenças infecciosas. Estudos laboratoriais têm mostrado que produtos vegetais de *Raphiodon echinus* já apresentaram efeitos antibacterianos (SOUZA; RODRIGUES, 2012), anti-inflamatórios e analgésicos (ALBUQUERQUE et al., 2007). Na literatura científica encontra-se também o trabalho de Duarte et al. (2016) que avaliou o efeito antioxidante dos extratos etanólicos e aquoso desta planta, no entanto, poucos estudos farmacológicos foram realizados com o óleo essencial extraído das folhas de *Raphiodon echinus*. Tornando-se assim justificável a pesquisa sobre o potencial antioxidante e antifúngico do óleo essencial de *Raphiodon echinus*.

## REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M.; LINS NETO, A. M. F.; MELO J. G.; DOS SANTOS, J. P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal Ethnopharmacology**, v.114, p. 325–354, 2007.
- ALMEIDA, L.F.D. et al. Screening da atividade antifúngica de óleos essenciais sobre *Candida albicans*. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v.14, n.4, p.51-6, 2010.
- ANTHONY, K. P.; DEOLU-SOBOGUN, S. A.; SALEH, M. A. Comprehensive Assessment of Antioxidant Activity of Essential Oils. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 8, 2012.
- 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.
- ATOUI, A.K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, v.89, n.1, p. 27-36, 2005.
- 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.
- 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.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v.29, n.1, p. 113-123, 2006.
- CAVALCANTI, Y.W. et al. Efeito inibitório de óleos essenciais sobre microrganismos do canal radicular. **Revista de Odontologia da UNESP**, v.40, n.5, p.226-33, 2011.
- 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.

CHIAPPELLI, F. The molecular immunology of mucositis: implications for evidence-based research in alternative and complementary palliative treatments. **Evid. Based Complement Alternat. Med**, v.2, n.4, p.489–494, 2005.

CHOI, C. W.; KIM, S.C.; HWANG, S.S.; CHOI, B.K.; AHN, H.J.; LEE, M.Y, et al. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**, v.163, p.8–1161, 2002.

COSTA, D. A.; OLIVEIRA, G. A. L.; SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M. Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* do composto ciano-carvona. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.33, n.4, p.567-575, 2012.

CUBA LF, Salum F, Cherubini K, Figueiredo MAZ. Antioxidant agentes: A future alternative approach in the prevention and treatment of radiation-induced oral mucositis ? **Alternative Therapies in Health and Medicine**, v 21, p. 36-41, 2015.

DUARTE, M.C.T. et al. Anti-*Candida* activity of essential oils and extracts from native and exotic medicinal plants used in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, n.2, p.305-11, 2005.

DUARTE, A. E.; WAGZVK, E. P.; ROVERSI, K.; SILVA, M. A. P.; RARROS, L. M.; CUNHA, F. A. B.; MENEZES, I. R. A.; COSTA, J. G. M; BOLIGON, A. A.; ADEMILUVI, A. O.; KAMDEM, J. P.; ROCHA, J. B. T.; BURGER, M. Polyphenolic Composition and Evaluation of Antioxidant Activity, Osmotic Fragility and Cytotoxic Effects of *Raphiodonechinus* (Nees& Mart) Schauer. **Molecules**, v. 21, p. 2-15, 2016.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatil e Constituents: A Review. **Phytotherapy research**, v. 21, n. 4, p. 308–323, 2006.

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.

FREITAS, R.C.; AZEVEDO, R. R. S; SOUZA, L. I. O.; ROCHA, T. J. M.; SANTOS, A. F. Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante das espécies *Plectranthusamboinicus* (Lour.) e *Mentha x villosa* (Huds.). **Revista Ciência e Farmacologia Básica Aplicada**, v. 35, n. 1, p. 113-118, 2014.

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.

HORVATHOVA, E.; NAVAROVA, J.; GALOVA, E.; SEVCOVICOVA, A.; CHODAKOVA, L. et al. Assessment of antioxidative, chelating, and DNA-Protective effects of selected essential oil components (Eugenol, Carvacrol, Thymol, Borneol, Eucalyptol) of plants and intact *rosmarinus officinalis* oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 28, p. 6632–6639, 2014.

MENEZES, F. S.; KAPLAN, M. A. K.; CARDOSO, G. L. C; PEREIRA, N. A. Phytochemical and pharmacological studies on *Raphiodon echinus*. **Fitoterapia**, v.69, n. 5, p. 459-460, 1998.

MENEZES, F. S.; KAPLAN, M. A. C. In-mixture analysis of triterpenes from *Raphiodon echinus*. **Revista Latino Americana de Química**, v.34, n .1/3, p. 37-41, 2006.

NUCCI, M.; COLOMBO, A. L.; Emergence of resistant *Candida* in neutropenic patients. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.6, n. 3, p. 124-128, 2002.

NUCCI, M.; COLOMBO, A. L. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v 58, p.77-82, 2007.

PEREIRA, A. L. F.; VIDAL, T.F.; CONSTANT, P. B. L. Dietary antioxidants: chemical and biological importance. **Brazilian Journal of Food and Nutrition**, v. 34, n. 3, p. 231-247, 2009.

PITARO, S. P.; JORGE, N.; FIORANI, L. V. Efeito antioxidante do extrato de manjeriço em óleo de soja sob condições de oxidação. **UNESP**, v. 8, n. 1, p. 33-36, 2009.

RATNAM, D. V.; ANKOLA, D. D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D. K.; KUMAR, M. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**, v. 113, n. 2, p. 189-207, 2006.

ROMERO A, R. B.; ROMEROA, A. L. Inibição de Ciclo oxigenases 1 (COX-1) e 2 (COX-2) por Monoterpenos: um Estudo in Silico. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v.16, n.4, p. 307-316, 2014.

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**. Ed. 5. Porto Alegre, RS: Ed. da UFSC, Cap. 16, p. 403-434, 2004.

SANTOS, L. O.; REIS, M. R.; OGAVA, L. E.; LEÃO, K. V.; MACHADO, L. L.; LIRA, S. P. Avaliação da Atividade Antioxidante dos Compostos Fenólicos Presentes na *Amburana cearenses*. **Orbital: The Electronic Journal Chemistry**, v. 8, n. 1, p. 44-49, 2016.

SIANI, A. C.; Sampaio, A. L. F.; SOUZA, M.G.; Henriques M. G. M. O.; RAMOS, M. F. S. Óleos essenciais. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.3, n.16, p.38-43, 2000.

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.

SIQUI, A. C.; SAMPAIO, A. L. F.; SOUSA, M. C. Óleos essenciais - potencial antiinflamatório. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 16, p. 38-43, 2000

SIZER, F.; WHITNEY, E. **Nutrição: conceitos e controvérsias**. 8. ed. Barueri: Manole, 2003.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S. C.; ARAUJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAUJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v.30, p. 351-355, 2007.

SOUZA, A. A.; RODRIGUES, S. A. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *RHAPHIODON ECHINUS* (NEES & SHAUER. MART) **BioFar**, v. 7, n. 2, p. 12-17, 2012.

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.

YUHONG, H.; WEI, G.; PEIHUAN, W.; LANLAN, X.; ZHAOLING, W.; GAOYI, W.; CHUNLING, W. Simultaneous Detection of Four Common Oral Candida Species from Blood Samples by the Fluorescence Polarization Assay.(Report). **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 71, n. 2, p. 919-926, 2015.

### 3.ARTIGOS CIENTÍFICOS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE  
*Rhaphiodon echinus* Ness Mart. Schauer (Lamiaceae): ESTUDOS IN SILICO E IN  
VITRO**

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIOXIDANTE DEL ACEITE ESENCIAL DE  
*Rhaphiodon echinus* Ness Mart. Schauer (Lamiaceae): IN SILICO E IN VITRO  
STUDY**

**EVALUATION OF THE POTENTIALANTIOXIDANT OF THE ESSENTIAL OIL OF  
*Rhaphiodon echinus* Ness Mart. Schauer (Lamiaceae): ESTUDIO IN SILICO E IN  
VITRO**

RAFAEL CARTAXO **FILGUEIRA**<sup>1</sup>; DANIELE DE SOUZA **SIQUEIRA**<sup>1</sup>; JOSÉ LUCAS SOARES **FERREIRA**<sup>1</sup>; JOYCE NATIELLE MIRANDA **CAVALCANTE**<sup>1</sup>; REBECA CÍCERA MENDES DE OLIVEIRA **SILVA**<sup>1</sup>; RAQUEL VIEIRA **BEZERRA**<sup>1</sup>; HELOÍSA MARA BATISTA FERNANDES DE **OLIVEIRA**<sup>2</sup>; MARGARETH DE FÁTIMA FORMIGA MELO **DINIZ**<sup>3</sup>; HILZETH DE LUNA FREIRE **PESSOA**<sup>4</sup>; GABRIELA LEMOS DE AZEVEDO **MAIA**<sup>5</sup>, ABRAHÃO ALVES DE **OLIVEIRA FILHO**<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidade acadêmica de ciências biológicas, UFCG, Universidade Federal de Campina Grande, 58708-110 Patos-PB, Brasil

<sup>2</sup>Hospital Universitário Ana Bezerra, UFRN , Universidade Federal do Rio grande do Norte, 59200-000 Santa Cruz-RN, Brasil

<sup>3</sup>UFPB, Universidade Federal da Paraíba, 58051-900 João Pessoa-PB, Brasil

<sup>4</sup>UFPB, Universidade Federal da Paraíba, 58051-900 João Pessoa-PB, Brasil

<sup>5</sup> UNIVASF, Universidade Federal do Vale do São Francisco, 56304-205, Petrolina-PE, Brasil

#### **RESUMO**

Os óleos essenciais de plantas, bem como os compostos derivados destes óleos como os terpenos, têm atraído cada vez mais interesse por causa das suas

propriedades antioxidantes. Um óleo essencial pouco estudado é o extraído da planta *Rhaphiodon echinus*, uma espécie vegetal brasileira, que pertence a família Lamiaceae e conhecida popularmente como "Betonica". Como objetivo principal procurou-se avaliar a atividade antioxidante do óleo essencial de *Rhaphiodon echinus* Ness Mart. Schauer (Lamiaceae), bem como dos principais fitoconstituintes deste óleo. Para isso, utilizou-se tanto técnicas *in silico*, através do programa PASS online<sup>®</sup>, quanto *in vitro*, por meio de testes com o íon ferroso ( $Fe^{2+}$ ). Todos os testes *in vitro* foram feitos em triplicata. Os resultados dos testes *in vitro* mostraram uma atividade antioxidante satisfatória do óleo essencial contra o íon ferroso. Além disso, a análise farmacológica *in silico* dos principais fitoconstituintes do óleo demonstrou uma ampla lista de atividades, tais como, anti-inflamatória e antineoplásica, que estão diretamente relacionadas com atividade antioxidante. Assim pôde-se concluir que o óleo essencial de *Rhaphiodon echinus* Ness Mart. Schauer é portador de um potencial antioxidante. Sendo um promissor produto para o uso na odontologia.

**Palavras-chave:** fitoterapia, farmacologia, odontologia.

## RESUMEN

Los aceites esenciales de plantas, así como los compuestos derivados de estos aceites como los terpenos, han atraído cada vez más interés debido a sus propiedades antioxidantes. Un aceite esencial poco estudiado es el extraído de la planta *Rhaphiodon echinus*, una especie vegetal brasileña, que pertenece a la familia Lamiaceae y conocida popularmente como "Betonica". Como objetivo principal se buscó evaluar la actividad antioxidante del aceite esencial de *Rhaphiodon echinus* Ness Mart. Schauer (Lamiaceae), bien de los principales fitoconstituyentes de este aceite. Para ello, se utilizaron tanto técnicas *in silico*, a través del programa PASS online<sup>®</sup>, como *in vitro*, por medio de pruebas con el ion ferroso ( $Fe^{2+}$ ). Todas las pruebas *in vitro* se realizaron en triplicada. Los resultados de las pruebas *in vitro* mostraron una actividad antioxidante



satisfactoria del aceite esencial contra el ion ferroso. Además, el análisis farmacológico in silico de los principales fitoconstituyentes del aceite demostró una amplia lista de actividades, tales como, anti-inflamatoria y antineoplásica, que están directamente relacionadas con la actividad antioxidante. Así se pudo concluir que el aceite esencial de *Rhaphiodon echinus* Ness Mart. Schauer es portador de un potencial antioxidante. Siendo un prometedor producto para el uso en la odontología.

**Palabras clave:** fitoterapia, farmacología, odontología.

### **ABSTRACT**

The essential oils of plants, as well as their derivatives, such as terpenes, have attracted more and more interest because of their antioxidant properties. An essential oil rarely studied and extracted from the *Rhaphiodon echinus* plant, a Brazilian plant species, which belongs to the Lamiaceae family and is popularly known as "Betonica". The main objective was to evaluate an antioxidant activity of the essential oil of *Rhaphiodon echinus* Ness Mart. Schauer (Lamiaceae), well from leading manufacturers. For this, use both silicon techniques, through the PASS online® program, and in vitro, by means of tests with the ferrous ion ( $Fe^{2+}$ ). All in vitro tests were done in triplicate. The in vitro test results showed a satisfactory antioxidant activity of the essential oil against the ferrous ion. In addition, a pharmacological analysis in silicon of the main products prevent a wide variety of activities, such as anti-inflammatory and antineoplastic, which are related to antioxidant activity. Thus it can be concluded that the essential oil of *Rhaphiodon echinus* Ness Mart. Schauer carries a potential antioxidant. Being a promising product for use in dentistry.

**Keywords:** phytotherapy, pharmacology, dentistry.

## INTRODUÇÃO

A oxidação é um processo necessário para a manutenção da vida, assim a existência de radicais livres no organismo é um processo natural, no qual estes são fundamentais para diversas funções como na produção de energia e na regulação do crescimento celular <sup>1,2,3</sup>.

No entanto, o excesso de oxidação biológica pode causar danos ao organismo devido a produção exacerbada de radicais livres. Muitos estudos apresentaram evidências de que os radicais livres e outros oxidantes em excesso são responsáveis pelo envelhecimento e pelas doenças degenerativas associadas a ele, como as doenças cardiovasculares e as doenças da cavidade bucal, como a doença periodontal e doenças como a mucosite oral <sup>3,4</sup>.

Nesse contexto surgem os agentes antioxidantes, que por sua vez tem a capacidade de proteger as moléculas dos danos causados por estes radicais e servem ainda como agentes quimioprotetores, inibindo a geração de radicais livres e tendo um importante papel na neutralização de danos oxidativos causados por esses radicais<sup>5</sup>.

Alguns trabalhos têm demonstrado a associação entre antioxidantes e estado de saúde bucal. De acordo com o estudo feito por Cuba<sup>6</sup>, o estresse oxidativo é considerado um dos fatores preponderantes para que sejam ativados eventos responsáveis pela mucosite oral e uma das maneiras de evitar a formação exagerada desses radicais pode-se abrir mão da utilização de agentes antioxidantes como as vitaminas E e C.

Recentemente, os óleos essenciais de plantas medicinais têm atraído cada vez mais interesse por causa das suas propriedades antioxidantes, e conseqüentemente têm sido extensivamente estudados principalmente em sistemas *in vitro*<sup>7</sup>.

Os óleos essenciais são compostos por mesclas de substâncias voláteis originados do metabolismo secundário das plantas, são uma fonte farta de compostos biologicamente ativos<sup>8</sup>. Biologicamente, são produzidos como mecanismo de defesa ou para atração de polinizadores.<sup>9</sup>Os óleos essenciais têm sido largamente utilizados pelas

indústrias farmacêuticas, sanitárias, cosmética, agrícolas e de alimentos devido às suas propriedades medicinais<sup>10</sup>.

Um exemplo de óleo essencial pouco relatado na literatura científica com relação as suas propriedades farmacológicas é o óleo extraído da planta *Rhaphiodon echinus*, uma espécie vegetal brasileira, pertencente à família Lamiaceae e conhecida popularmente como “Betonica” e “flor-de-urubu”. Na medicina popular, suas folhas são utilizadas para diversos fins terapêuticos como por exemplo: tratamento da tosse, inflamação na cavidade oral e infecções no trato genitourinário<sup>11,12</sup>.

Desta forma, com base nas informações sobre o potencial terapêutico dos óleos essenciais e a importância do combate da formação dos radicais livres para a saúde bucal, esse trabalho procura avaliar a possível atividade antioxidante do óleo essencial de *Rhaphiodon echinus* Ness Mart. Schauer (Lamiaceae).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### *ENSAIOS IN VITRO E IN SILICO*

#### **Substância-teste**

Para os ensaios foi utilizado o óleo essencial extraído das folhas de *Rhaphiodon echinus*, que foi cedido pela equipe da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gabriela Lemos de Azevedo Maia, da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF). Esta equipe realizou a análise em Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/SM) do óleo, que demonstrou como principais componentes fitoquímicos: o espatulenol (30,27 %), o aromadendreno(8,3 %), o cadin-4-en-10-ol (7,77 %) e o β-bourboneno (7,25%).

#### **Reagentes**

Os reagentes que foram utilizados nos experimentos laboratoriais foram: Ferrozina (ácido 3-(2-piridil)-5,6-bis (4-fenilsulfônico)-1,2,4-triazina) e o cloreto ferroso (FeCl<sub>3</sub>) todos foram adquiridos da indústria Sigma-Aldrich (Brasil).

#### **Determinação da atividade antioxidante do óleo essencial de *Rhaphiodon echinus* sobre o íon ferroso (Fe<sup>2+</sup>)**

A técnica que foi utilizada foi descrita por EleKarakaya, para verificar o efeito quelante do íon ferroso pelo óleo essencial, diferentes concentrações do produto natural, 50, 100, 200, 400 e 800 e 1000 µg/mL, foram misturadas com 50 µL de FeCl<sub>2</sub> (2 mM) e 200 µL de ferrozina (5mM). Depois esta mistura foi incubada durante 10 minutos à temperatura ambiente e a absorbância será então medida a 512nm. O controle negativo foi feito com a utilização de FeCl<sub>2</sub>, ferrozina e veículo. A porcentagem de inibição foi determinada a partir da seguinte fórmula: % inibição = 100 x (controle – experimental) / Controle<sup>13</sup>.

### **Estudo das propriedades antioxidantes *in silico* dos principais fitoconstituintes do óleo essencial de *Raphiodon echinus***

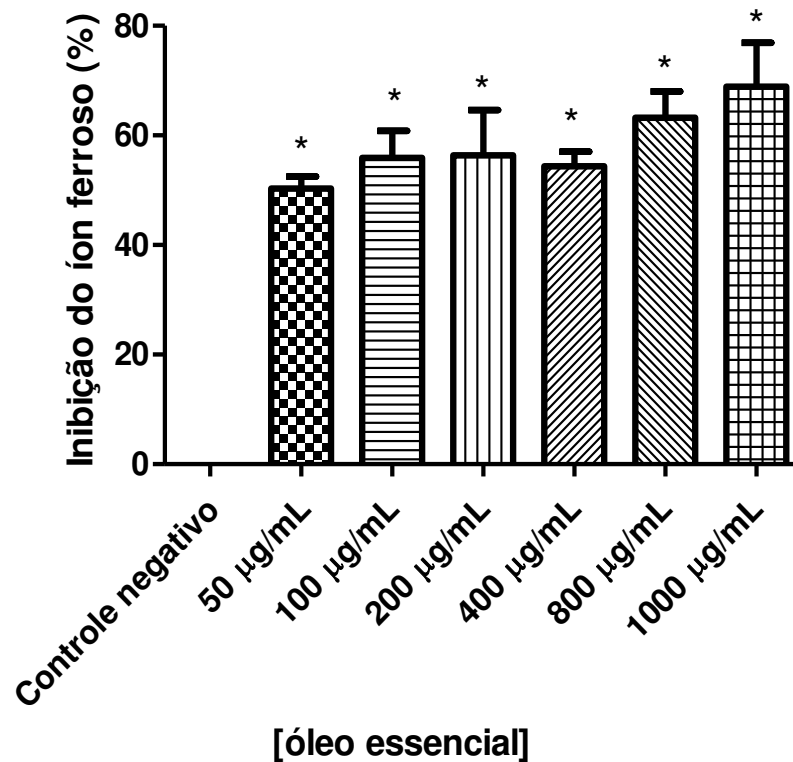
Para a análise *in silico* dos principais fitoconstituintes do óleo essencial foi utilizado o programa computacional gratuito PASS online. A previsão do espectro de atividade para substâncias (PASS) online é um software gratuito que objetiva avaliar o potencial biológico e farmacológico de uma molécula orgânica quando em contato com o organismo humano. Por meio deste, é possível ter previsões simultâneas de múltiplos tipos de atividades biológicas com base na estrutura dos compostos orgânicos, além de permitir estimar o potencial de atividade de uma substância, podendo esta ser classificada como índices Pa (probabilidade "de ser ativo") e Pi (probabilidade "de ser inativo"), podendo ser acessado pelo endereço:<http://www.pharmaexpert.ru/passonline/><sup>14</sup>.

### **Análise estatística**

Todas as análises e testes foram realizados em triplicata, onde os dados foram tratados por regressão linear simples através do método one-way ANOVA, com pós teste Bonferroni. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando apresentarem p<0,05. A análise estatística foi feita utilizando o software GraphPadPrism5.0®.

## RESULTADO

Ao analisar os dados obtidos pela técnica *in vitro* pode-se perceber que o óleo essencial *Rhaphiodon echinus* Ness Mart. Schauer (Lamiaceae), apresenta um efeito antioxidante satisfatório contra o íon ferroso (Gráfico 1).



**Gráfico 1:** Porcentagem de inibição do íon ferroso pelo óleo essencial de *Rhaphiodon echinus* Ness Mart. Schauer (Lamiaceae). \* $p < 0,05$  concentrações do óleo essencial *versus* controle negativo. c

Após a análise *in vitro* do óleo, realizou-se análise *in silico* dos componentes majoritários desse produto natural. Com relação ao espectro de atividades dos principais constituintes fitoquímicos do *Rhaphiodon echinus*, que são: o espatulenol, o aromadendreno, o cadin-4-en-10-ol e o  $\beta$ -bourboneno, por meio da utilização do programa *PASS Online*<sup>®</sup>, puderam ser observados diversos efeitos farmacológicos

relacionados ao potencial antioxidante, estes dados foram agrupados em tabela com seus respectivos “Pa” – probabilidade de ser ativo, e “Pi” – probabilidade de ser inativo (Tabelas 1,2,3 e 4).

**TABELA 1:** Atividades farmacológicas teóricas do espatulenol de interesse, de acordo com o programa *PASS Online*<sup>®</sup>.

<i>Pa</i>	<i>Pi</i>	<i>Atividade</i>
0,521	0,051	Antiinflamatório
0,753	0,018	Antineoplásico
0,224	0,174	Antitrombótico
0,268	0,233	Citoprotetor
0,414	0,029	Hepatoprotetor

FONTE: SILVA, 2019

**TABELA 2:** Atividades farmacológicas teóricas do aromadendreno de interesse, de acordo com o programa *PASS Online*<sup>®</sup>.

<i>Pa</i>	<i>Pi</i>	<i>Atividade</i>
0,318	0,145	Antiinflamatório
0,826	0,009	Antineoplásico
0,313	0,093	Antitrombótico
0,312	0,172	Citoprotetor
0,274	0,070	Hepatoprotetor

FONTE: SILVA, 2019

**TABELA 3:** Atividades farmacológicas teóricas do cadin-4-en-10-ol de interesse, de acordo com o programa *PASS Online*<sup>®</sup>.

<i>Pa</i>	<i>Pi</i>	<i>Atividade</i>
0,566	0,039	Antiinflamatório
0,739	0,020	Antineoplásico
0,363	0,069	Antitrombótico
0,340	0,141	Citoprotetor
0,399	0,032	Hepatoprotetor

FONTE: SILVA, 2019

**TABELA 4:** Atividades farmacológicas teóricas do  $\beta$ -bourboneno de interesse, de acordo com o programa *PASS Online*<sup>®</sup>.

<i>Pa</i>	<i>Pi</i>	<i>Atividade</i>
0,660	0,021	Antiinflamatório
0,930	0,005	Antineoplásico
0,329	0,085	Antitrombótico
0,559	0,045	Citoprotetor
0,445	0,025	Hepatoprotetor

FONTE: SILVA, 2019

## DISCUSSÃO

O consumo de antioxidantes naturais, como os compostos fenólicos presentes na maioria das plantas que inibem a formação de radicais livres, também chamados de substâncias reativas, tem sido associado a uma menor incidência de doenças relacionadas com o estresse oxidativo<sup>15</sup>.

Os condimentos, por exemplo, da família *Lamiaceae* têm sido extensivamente estudados devido ao caráter antioxidante de seus compostos fenólicos, porém apenas o alecrim tem sido mais amplamente utilizado em produtos alimentícios. Mariutti e Bragagnolo em sua revisão sobre os principais antioxidantes naturais da família *Laminaceae* abordam os compostos responsáveis pela atividade antioxidante e suas aplicações em produtos<sup>16</sup>.

Vários óleos essenciais da família *Laminaceae*, a mesma do *Rhaphiodon echinus*, apresentam relatos de atividade antioxidante na literatura, dentre eles estão: *Melissa officinalis* L.<sup>17</sup>, *Mentha aquática* L., *Mentha longifolia*<sup>18</sup>, *Mentha piperita* L.<sup>19</sup>, *Rosmarinus officinalis*L.<sup>20</sup>, *Salvia runcinata*<sup>21</sup>, *Satureja spicigera*, *Satureja cuneifolia*<sup>22</sup>, *Satureja hortensis* L.<sup>23</sup>, *Thymus caespititius* Brot., *Thymus camphoratus*<sup>24</sup>, *Thymus pectinatus* Fisch<sup>25</sup>, *Thymus vulgaris* L.<sup>20</sup>, *Zataria multiflora* Boiss<sup>26</sup>. Além disso, os dados desta pesquisa corroboram com os resultados obtidos Duarte et al. (2018)<sup>27</sup>.

Os resultados apresentados vão ao encontro a muitos estudos na literatura, os quais demonstram que diversos monoterpenos apresentam atividade anti-inflamatória,

atividade antineoplásica, que estão relacionados com ação antioxidante, entre algumas outras atividades<sup>28,29</sup>.

## CONCLUSÃO

Em vista dos resultados obtidos, pôde-se observar que o óleo essencial apresentou atividade antioxidante *in vitro*, bem como, seus compostos majoritários apresentaram um variado espectro de atividades farmacológicas *in silico*, em especial, o efeito anti-inflamatório e antineoplásica.

## REFERÊNCIAS

1. Atoui AK, Mansouri A, Boskou G, Kefalas P. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chem*, 2005;89(1):27-10.
2. Barreiros ALBS, David JM, David JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quím Nova*, 2006;29(1):113-11.
3. Santos LO, Reis MR, Ogava LE, Leão KV, Machado LL, Lira SP. Avaliação da Atividade Antioxidante dos Compostos Fenólicos Presentes na *Amburana cearenses*. *Orbital: Electron. J. Chem.* 2016;8(1):44-6.
4. Sousa CMM, Silva HR, Vieira-jr GM, Ayres MCC, Costa CLSC, Araujo DS, et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quím Nova*. 2007;30: 351-5.
5. Anthony KP, Deolu-sobogun SA, Saleh MA. Comprehensive Assessment of Antioxidant Activity of Essential Oils. *J Food Sci.* 2012;77(8):839-5.



6. Cuba LF, Salum F, Cherubini K, Figueiredo MAZ. Antioxidant agentes: A future alternative approach in the prevention and treatment of radiation-induced oral mucositis ? *Altern Ther Health Med*. 2015;21:36-6.
7. Horvathova E, Navarova J, Galova E, Sevcovicova A, Chodakova L. et al. Assessment of antioxidative, chelating, and DNA-Protective effects of selected essential oil components (Eugenol, Carvacrol, Thymol, Borneol, Eucalyptol) of plants and intact *rosmarinus officinalis* oil. *J Agric Food Chem*. 2014;62(28):6632–6639.
8. Gonçalves LA, Barbosa LCA, Azevedo AA, Casali VWD, Nascimento EA. Produção e composição do óleo essencial de Alfavaquinha (*Ocimum selloi* Benth.) em resposta a dois níveis de radiação solar. *Rev Bras Plantas Med*. 2003;6(1):8-7.
9. Siani AC, Sampaio ALF, Souza MG, Henriques MGMO, Ramos MFS. Óleos essenciais. *Biotecnologia Cienc Desenvol*. 2000;3(16):38-6.
10. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem Toxicol*. 2008;46(2):446–475.
11. Albuquerque UP, Medeiros PM, Almeida ALS, Monteiro JM, Lins neto AMF, Melo JG, et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. *J. Ethnopharmacol*. 2007;114:325–29.
12. Menezes FS, Kaplan MAK, Cardoso GLC, Pereira NA. Phytochemical and pharmacological studies on *Raphiodon echinus*. *Fitoterapia*. 1998; 69(5):459-2.
13. El SN, Karakaya S. Radical scavenging and iron-chelating activities of some greens used as traditional dishes in Mediterranean diet. *Int J FoodSci Nutr*. 2004;55:67-8.

14.Srinivas N, Sandeep KS, Anusha Y, Devendra BN. *In Vitro*Cytotoxic Evaluation and Detoxification of Monocrotaline (Mct) Alkaloid: An In Silico Approach. *Int Inv J Biochem Bioinform.* 2014;2(3):20-10.

15.Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.*2002;82:47-48.

16.Mariutti LRB, Braganolo N. Revisão: Antioxidantes naturais da família Lamiaceae - Aplicação em produtos alimentícios. *Braz J Food Technol.* 2007;10: 96-8.

17.Mimica-dukic N, Bozin B, Sokovic M, Simin N. Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil. *J Agr and Food Chem.* 2004;52(9):2485-5.

18.Mimica-dukic N, Bozin B, Sokovic M, Mihajlovic B, Matavulj, M. Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. *Planta Med.* 2003;69(5):413-7.

19.Yadegarinia D, Gachkar L, Rezaei MB, Taghizadeh M, Astanesh SA, Rasooli I. Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. *Phytochemistry.* 2006;67(12):1249-55.

20.Sacchetti G, Silvia maietti S, Muzzoli MV, Scaglianti M, Manfredini S, Radice M, et al. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chem.* 2005;91:621–12.

21. Kamatoua GPP, Viljoen AM, Gono-bwalya AB, Van zyl RL, Van-vuuren SF, Lourens ACU, et al. The in vitro pharmacological activities and a chemical investigation of three South African *Salvia* species. *J of Ethnopharm.* 2005;102:382–8.

22. Eminagaoglu O, Tepe B, Yumruta O, Askin-akpulat H, Daferera D, Polissiou M, et al. The in vitro antioxidative proprieties of the essential oil and methanol extract of *Satureja spicigera* (K. Koch.) Boiss. and *Satureja cuneifolia* ten. *Food Chem.* 2007;100:339-5.

23. Gulluce M, Sokmen M, Daferera D, Agar G, Ozkan H, Kartal N, et al. In vitro antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L. *J Agrc Food Chem.* 2003;51(14):3958-65.

24. Miguel G, Simões M, Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Carvalho L. Composition and antioxidant activities of the essential oils of *Thymus caespititius*, *Thymus camphoratus* and *Thymus mastichina*. *Food Chem.* 2004;86:183-6.

25. Vardar-ünlü G, Candan F, Sökmen A, Daferera D, Polissiou M, Sökmen M, et al. Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and metanol extract of *Tymus pectinatus* Fish. et Mey. var. *pectinatus* (Lamiaceae). *J Agrc Food Chem.* 2003;51:63-5.

26. Sharififar F, Moshafi MH, Mansouri SH, Hhodashenas M, Khoshnoodi M. In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. *Food Control.* 2007;18(7):800-6.

27. Rodrigues Costa A, PS Pereira, MK Alves de Sousa, et al. Potential antioxidant and toxicological activity of the essential oil of *Rhaphiodon echinus* (Nees & Mart) Schauer

(Lamiaceae): morphoanatomy and polyphenolic composition of its extracts. *Int. J. Exp. Bot.* 2018, 87: 79-86.

28.Kawata J, Kameda M, Miyazawa M. Cyclooxygenase-2 inhibitory effects of monoterpenoids with a *p*-methane skeleton. *Int J Essen Oil Ther.* 2008;2:145-4.

29.Badrhaddad A, Piri KH, Mansouri K. In vitro anti-angiogenic activity fractions from hydroalcoholic extract of *Elaeagnus angustifolia* L. flower and *Nepeta crispa* L. arial part. *J Med Plant Res.* 2012;6(31):4633-7.

# AValiação DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *RHAPHIODON ECHINUS* NESS MART. SCHAUER (LAMIACEAE)

EVALUATION OF ANTIFUNGAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL OF *RHAPHIODON ECHINUS* NESS MART. SCHAUER (LAMIACEAE)

RAFAEL CARTAXO FILGUEIRA<sup>1</sup>; DANIELE DE SOUZA SIQUEIRA<sup>1</sup>; JOSÉ LUCAS SOARES FERREIRA<sup>1</sup>; JOYCE NATIELLE MIRANDA CAVALCANTE<sup>1</sup>; REBECA CÍCERA MENDES DE OLIVEIRA SILVA<sup>1</sup>; RAQUEL VIEIRA BEZERRA<sup>1</sup>; HELOÍSA MARA BATISTA FERNANDES DE OLIVEIRA<sup>2</sup>; MARGARETH DE FÁTIMA FORMIGA MELO DINIZ<sup>3</sup>; HILZETH DE LUNA FREIRE PESSOA<sup>4</sup>; GABRIELA LEMOS DE AZEVEDO MAIA<sup>5</sup>, ABRAHÃO ALVES DE OLIVEIRA FILHO<sup>6</sup>

1. ACADÊMICO DO CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA DA UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS- UFCG.

2. FARMACÊUTICA-BIOQUÍMICA, DOUTORA EM FARMACOLOGIA, HOSPITAL UNIVERSITÁRIO ANA BEZERRA- UFRN.

3. DOUTORA EM FARMACOLOGIA, DOCENTE DA UFPB.

4. DOUTORA EM FARMACOLOGIA, DOCENTE DA UFPB.

5. DOUTORA EM FARMACOLOGIA, DOCENTE DA UNIVASF.

6. DOUTOR EM FARMACOLOGIA, DOCENTE DA UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS- UFCG.

## RESUMO

A cavidade oral humana possui cerca de vinte gêneros e, aproximadamente, noventa espécies de leveduras isoladas e classificadas; dentre estas, oito espécies do gênero *Candida* foram consideradas patogênicas oportunistas causadoras de candidíase oral. 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. Um exemplo de óleo essencial pouco relatado na literatura científica com relação as suas propriedades farmacológicas é o óleo oriundo da planta *Rhaphiodon echinus*. Na medicina popular, suas folhas são utilizadas para diversos fins terapêuticos, dentre eles o tratamento de infecções no trato genito-urinário. Desta forma, o presente trabalho objetivou analisar a atividade antifúngica do óleo essencial de *Rhaphiodon echinus* sobre cepas de *Candida albicans*, *tropicalis* e *krusei*, obtendo a Concentração Inibitória Mínima (CIM) por meio de ensaios *in vitro* utilizando a técnica de microdiluição em caldo. A CIM<sub>50%</sub> para *Candida albicans* e *Candida tropicalis* é de 512 µg/mL. A CIM<sub>50%</sub> para *Candida krusei* é de 256 µg/mL. Conclui-se que o óleo essencial de *Rhaphiodon echinus* é eficaz contra as cepas de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, sendo assim, mais estudos são necessários para desvendar o mecanismo de ação da atividade antifúngica deste produto natural.

**Palavras-chave:** Plantas medicinais, Microbiologia, Candidíase oral.

## ABSTRACT

The human oral cavity has about twenty genera and approximately ninety species of yeasts isolated and classified; Among these, eight species of the genus *Candida* were considered opportunistic pathogens causing oral candidiasis. Increasing resistance to antifungal agents, therapeutic limitations, inefficiency, toxicity, drug interactions and the insufficient bioavailability of antifungal drugs, currently available, make difficult the treatment of human fungal infections and these stimulate the search for new therapeutic alternatives between the aromatic plants and their essential oils, empirically used for their antifungal properties. An example of essential oil, little reported in the scientific literature due to its pharmacological properties, It's the oil from the *Rhaphiodon echinus* plant. In folk medicine, its leaves are used for various therapeutic purposes, among them the treatment of infections in the genitourinary tract. Thus, the present

work aimed to analyze the antifungal activity of *Rhaphiodon echinus* essential oil on strains of *Candida albicans*, *C. tropicalis*, and *C. krusei* strains, obtaining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) by means of in vitro assays using broth microdilution technique. The CIM-50% for *Candida albicans* and *Candida tropicalis* is 512 µg / mL. CIM-50% for *Candida krusei* is 256 µg / mL. It follows that the essential oil *Rhaphiodon echinus* is effective against the strains of *C. albicans*, *C. krusei* and *C. tropicalis*, thus, more studies are needed to uncover the mechanism of action of the antifungal activity of this natural product.

**Keywords:** Medicinal Plants, Microbiology, Oral Candidiasis.

## INTRODUÇÃO

A microbiota residente da boca é bastante diversificada, com mais de 700 espécies de microorganismos identificadas, das quais muitas ainda não foram formalmente descritas. Nessa vasta e complexa ecologia microbiana da cavidade bucal humana, encontram-se, pelo menos, vinte gêneros e, aproximadamente, noventa espécies de leveduras isoladas e classificadas; dentre estas, oito espécies do gênero *Candida* foram consideradas patogênicas oportunistas causadoras de candidíase oral: *Candida albicans*, *Candida guilliermondii*, *Candida kefyr*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida viswanathii* e *Candida glabrata*<sup>1,2</sup>.

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<sup>3,4</sup>.

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<sup>5,6,7</sup>.

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<sup>8,9,10</sup>, contendo uma série de substâncias que podem ser usadas para o tratamento de diferentes doenças infecciosas<sup>11</sup>.

Os óleos essenciais, misturas de compostos voláteis originados do metabolismo secundário das plantas, são uma rica fonte de compostos biologicamente ativos<sup>12</sup>. São conhecidos desde a antiguidade por possuir propriedades antibacterianas e antifúngicas<sup>6,13,14</sup>.

Um exemplo de óleo essencial pouco relatado na literatura científica com relação as suas propriedades farmacológicas é o óleo oriundo da planta *Rhaphiodon echinus*, uma espécie vegetal brasileira, pertencente a família Lamiaceae e conhecida popularmente como “Betônica” e “flor-de-urubu”. Na medicina popular, suas folhas são utilizadas para diversos fins terapêuticos como por exemplo: tratamento da tosse, inflamação na cavidade oral e infecções no trato genitourinário<sup>15,16</sup>.

Desta forma, com base nas informações sobre o potencial terapêutico dos óleos essenciais e a importância do combate as infecções fúngicas para a saúde bucal, esse trabalho objetivou avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial de *Rhaphiodon echinus* Ness Mart. Schauer (Lamiaceae) sobre cepas de *Candida albicans*, *tropicalis* e *krusei*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1.1 ENSAIOS IN VITRO

#### 1.1.1 Substância-teste

Para os ensaios foi utilizado o óleo essencial extraído das folhas de *Raphiodon echinus*, que foi cedido pela equipe da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gabriela Lemos de Azevedo Maia, da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF). Este óleo foi analisado em Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/SM), que demonstrou como principais componentes fitoquímicos: o espatulenol (30,27%), o aromadendreno (8,3%), o cadin-4-en-10-ol (7,77%) e o β-bourboneno (7,25%).

O óleo foi conservado em frasco de vidro âmbar e mantido sob refrigeração. As emulsões do óleo essencial nas diferentes concentrações foram preparadas no momento de execução dos ensaios. Em um tubo de ensaio esterilizado, foi adicionado 60.000 µg do óleo essencial, 0,15 mL de dimetilsulfóxido (DMSO),

0,06 mL de Tween 80 (INLAB/Indústria Brasileira) e quantidade suficiente para 3 mL de água destilada estéril. A mistura foi agitada por 5 minutos em aparelho Vortex (Fanem), obtendo uma emulsão com concentração de 20.000 µg/mL do óleo essencial, 5% de DMSO e 2% de Tween 80. E através de diluições em água destilada ou no próprio meio de cultura foram obtidas as concentrações desejadas do óleo essencial.

### 1.1.2 Espécies Fúngicas

Foram utilizadas quatro cepas de *Cândida albicans* (ATCC 76645, LM 106, LM 108 e LM 111), quatro cepas de *Cândida tropicalis* (ATCC 13803, LM 14, LM 31 e LM 36) e quatro cepas de *Cândida krusei* (LM 08, LM 13, LM 656, LM 978), previamente isoladas, identificadas e gentilmente cedidas pelo Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, sob a direção da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Edeltrudes de Oliveira Lima.

Todas as cepas foram mantidas em ágar Sabouraud dextrose (ASD) a uma temperatura de 4°C, sendo utilizados para os ensaios repiques de 24 horas em ASD incubados a 35 °C. No estudo da atividade antimicrobiana foi utilizado um inóculo fúngico de aproximadamente  $1 - 5 \times 10^6$  UFC/mL padronizado de acordo com a turbidez do tubo 0,5 da escala de McFarland<sup>17,18</sup>.

### 1.1.3 Meios de cultura

Foram utilizados os meios ágar Sabouraud dextrose - ASD (Difco Lab., USA) para manutenção dos micro-organismos; e caldo Sabouraud dextrose - CSD (Difco Lab., USA) para os ensaios *in vitro*; preparados conforme as instruções do fabricante.

### 1.1.4 Fármaco antifúngico

Foi utilizado como antifúngico padrão (controle positivo), a nistatina em pó (Pharma Nostra, Rio de Janeiro). As soluções foram preparadas no momento de execução dos testes, para alcance das concentrações desejadas.

### 1.1.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Concentração inibitória mínima do óleo essencial de *Raphiodon echinus* foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo<sup>17,18</sup>. Foram utilizadas placas de 96 orifícios estéreis e com tampa. Em cada orifício da placa, foram adicionado 100 µL do meio líquido caldo Sabouraud dextrose duplamente concentrado. Em seguida, 100 µL da emulsão do óleo essencial na concentração inicial de 2048 µg/mL (também duplamente concentrado), foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. E por meio de uma diluição seriada em razão de dois, foram obtidas as concentrações de 1024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8 e 4 µg/mL, de modo que na primeira linha da placa encontra-se a maior concentração e na última, a menor concentração. Por fim, foi adicionado 10 µL do inóculo de aproximadamente  $1-5 \times 10^6$  UFC/mL das espécies fúngicas nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se a uma cepa fúngica, especificamente.

Paralelamente, foi realizado um controle positivo com o antifúngico nistatina. Um controle de micro-organismo foi realizado colocando-se nas cavidades 100 µL do mesmo CSD duplamente concentrado, 100 µL de água destilada estéril e 10 µL do inóculo de cada espécie. Para verificar a ausência de interferência nos resultados pelos solventes utilizados na preparação da emulsão, no caso o DMSO (dimetilsulfóxido) e o Tween 80, foi feito um controle no qual foram colocados nas cavidades 100 µL do caldo duplamente concentrado, 50 µL de DMSO (5%), 50 µL de Tween 80 (2%) e 10µL da suspensão fúngica. Um controle de esterilidade do meio também foi realizado, onde foi colocado 200 µL do CSD em um orifício sem a suspensão dos fungos.

As placas foram assepticamente fechadas e incubadas a 35°C por 24 - 48 hs para ser realizada a leitura. A CIM para o óleo essencial e antifúngico é definida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento fúngico verificado nos orifícios quando comparado com o crescimento controle. Os experimentos foram realizados em duplicata.

## RESULTADOS

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é referida como a menor concentração de uma substância teste capaz de inibir o crescimento microbiano de maneira visível. Os dados obtidos estão presentes nas tabelas 5,6 e 7 abaixo. A CIM<sub>50%</sub> é dita como a menor concentração capaz de inibir 50% das cepas durante o

experimento; seguindo a premissa, observa-se que a CIM<sub>50%</sub> para *Candida albicans* e *Candida tropicalis* é de 512 µg/mL. A CIM<sub>50%</sub> para *Candida krusei* é de 256 µg/mL.

**Tabela 5.** Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL do óleo essencial de *Rhaphiodon echinus* contra cepas de *Candida albicans*.

<i>Rhaphiodon echinus</i>	
CEPA FÚNGICA	CIM
ATCC 76645	1024 µg/mL
LM 106	512 µg/mL
LM 108	512 µg/mL
LM 111	512 µg/mL

**Tabela 6.** Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL do óleo essencial de *Rhaphiodon echinus* contra cepas de *Candida tropicalis*.

<i>Rhaphiodon echinus</i>	
CEPA FÚNGICA	CIM
ATCC 13803	512 µg/mL
LM 14	512 µg/mL
LM 31	512 µg/mL
LM 36	1024 µg/mL

**Tabela 7.** Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL do óleo essencial de *Rhaphiodon echinus* contra cepas de *Candida krusei*.

<i>Rhaphiodon echinus</i>	
CEPA FÚNGICA	CIM
LM 08	512 µg/mL
LM 13	1024 µg/mL
LM 656	256 µg/mL
LM 978	256 µg/mL

## DISCUSSÕES

Segundo Sartoratto (2004)<sup>19</sup>, o potencial antifúngico é dito forte quando a CIM atinge valores entre 0,05 – 0,5 mg/mL, é considerado moderado entre 0,6 – 1,5 mg/mL e considerado fraco quando os valores da CIM ultrapassarem 1,5 mg/mL. O óleo essencial de *Rhaphiodon echinus* demonstrou forte atividade antifúngica sobre as cepas de *Candida albicans*, *tropicalis* e *krusei*, visto que obteve CIM<sub>50%</sub> entre 0,05 – 0,5 mg/mL.

Lund e colaboradores(2012)<sup>20</sup> testou a capacidade antifúngica do extrato hidroalcolico de *Mentha arvensis*, pertencente à família Lamiaceae, contra cepas de *Candida albicans* realizando três ensaios com métodos diferentes (métodos de difusão em ágar, macro e microdiluição em caldo). O autor em questão



concluiu que o extrato de *Mentha arvensis* foi capaz de inibir o crescimento das cepas fúngicas de *Candida albicans*.

Estudos de Lima e colaboradores(2006)<sup>21</sup> revelaram susceptibilidade de cepas de *Candida krusei* e *Candida tropicalis* para o óleo essencial de outra espécie vegetal pertencente à família Lamiaceae, a *Peumus boldus*. Entretanto, neste mesmo estudo pode-se observar que apenas uma cepa de *C.krusei* foi inibida quando sob a ação do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*, outra planta da família Lamiaceae<sup>21</sup>.

Valentini e colaboradores(2010)<sup>22</sup> e Montanari e colaboradores(2010)<sup>23</sup> demonstraram que o óleo essencial de *Siparuna guianensis Aublet* apresenta em sua composição espatulenol e aromadendreno, componentes observados no óleo essencial de *Rhaphiodon echinus*, e Arruda e colaboradores(2014)<sup>24</sup> evidenciou propriedades antifúngicas por parte deste óleo essencial de *Siparuna guianensis Aublet*. Em todos os casos acima citados, os óleos essenciais das outras plantas apresentam similaridades com o óleo da *Rhaphiodon echinus*, como a composição do óleo e o parentesco das espécies, e, além disso, propriedades antifúngicas.

Duarte e colaboradores(2017)<sup>25</sup> também evidenciaram o potencial antifúngico do óleo essencial de *Rhaphiodon echinus* em seus estudos, corroborando assim com os resultados encontrados nessa pesquisa.

### CONCLUSÃO

Conclui-se que o óleo essencial de *Rhaphiodon echinus* é eficaz contra as cepas de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, sendo assim, mais estudos são necessários para desvendar o mecanismo de ação da atividade antifúngica deste produto natural.

### FINANCIAMENTO

Esta pesquisa foi financiada pelo CNPq.

### REFERÊNCIAS

- [1] McIntyre G. Oral candidosis. Dent Update 2001.28:132-9.
- [2] Yuhong H, Wei G, Peihuan W, et al. Simultaneous Detection of Four Common Oral Candida Species from Blood Samples by the Fluorescence Polarization Assay.(Report). Cell Biochem and Biophys 2015.71(2):919-8.
- [3] Araújo JCLV, Lima EO, Ceballos BSO, et al. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microorganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. Rev Patol Trop 2004.33:55-10.
- [4] Vandeputte P, Ferrari S, Coste AT. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. Int J Microbiol 2012. 2012:1-26.
- [5] Barberán J, Mensa J, Fariñas C, et al. Recommendations of antifungal treatment in patients with low grade immunosuppression. Rev Esp Quimioter 2008.21(2):127-16.
- [6] Cavaleiro C, Pinto E, Gonçalves M J, et al. Antifungal activity of Juniperus essential oils against dermatophyte, *Aspergillus* and *Candida* strains. J Appl Microbiol 2006.100(6):1333-6.
- [7] Silva F M, Paula JE, Espindola L S. Evaluation of the antifungal potential of Brazilian Cerrado medicinal plants. Mycoses 2009.52(6):511-7.
- [8] Nakamura CV, Ishida K, Faccin LC, et al. In vitro activity of essential oil from *Ocimum gratissimum* L. against four *Candida* species. Res Microbiol 2004 .155(7):579-8.
- [9] Oliveira RAG, Lima EO, Vieira WL, et al. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. Rev Bras Farmacogn 2006.16(1):77-6.
- [10] Prabuseenivasan S, Jayakumar M, Ignacimuthu S. In vitroantibacterial activity of some plant essential oils. BMC Complement Altern Med 2006.6(39):1-8.
- [11] Saad A, Fadli M, Bouaziz M, et al. Anticandidal activity of the essential oils of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* and their synergism with amphotericin B and fluconazol. Phytomedicine 2010.17(13):1057-4.
- [12] Gonçalves LA, Barbosa LCA, Azevedo AA, et al. Nascimento EA. Produção e composição do óleo essencial de Alfavaquinha (*Ocimum selloi* Benth.) em resposta a dois níveis de radiação solar. Rev Bras Plantas Med 2003.6(1):8-7.
- [13] Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev 1999.12(4):564-19.

- [14] Tempone AG, Sartorelli P, Teixeira D, et al. Brazilian flora extracts as source of novel antileishmanial and antifungal compounds. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008.103(5):443-7.
- [15] Albuquerque UP, Medeiros PM, Almeida ALS, et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. *J. Ethnopharmacol* 2007.114:325–30.
- [16] Menezes FS, Kaplan MAK, Cardoso GLC, et al. Phytochemical and pharmacological studies on *Raphiodon echinus*. *Fitoterapia* 1998.69(5):459-2.
- [17] Cleeland R, Squires E. Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and in experimental animal infections. In: Lorian, V. M. D. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. New York: Willians & Wilkins, p. 739-788, 1991.
- [18] Hadacek F, Greger H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparatibility of results and assay choice. *Phytochem Anal* 2000.11:137-11.
- [19] Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 2004. 35:275 – 6.
- [20] Lund RG, Serpa R, Nascente PS, et al. In vitro study on the antimicrobial effect of hydroalcoholic extracts from *Mentha arvensis* L. (Lamiaceae) against oral pathogens. *Acta Scientiarum. Biological Sciences.* 2012.34(4):437-6.
- [21] Lima IO, Oliveira RAG, Lima EO, et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Rev Bras de Farmacogn* 2006.16:197-5.
- [22] Valentini CMA, Rodriguez-ortiz CE, Coelho MFB. *Siparuna guianensis* Aublet (negramina): uma revisão. *Rev bras plantas med* 2010.12(1):96-104.
- [23] Montanari RM. Composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais de espécies de Anacardiaceae, Siparunaceae e Verbenaceae. 173f. Tese. (Doutorado em Agroquímica). Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2010.
- [24] Arruda EL. Bioprospecção de óleos de de fungos endofíticos com potencial antifúngico. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, 2014.
- [25] Duarte AE, de Menezes IR, Bezerra Morais Braga MF, et al. Antimicrobial Activity and Modulatory Effect of Essential Oil from the Leaf of *Raphiodon echinus* (Nees & Mart) Schauer on Some Antimicrobial Drugs . *Molecules* 2017. 21: 2:14.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos durante os testes, pôde-se observar que o óleo essencial apresentou atividade antioxidante *in vitro*, bem como, seus compostos majoritários apresentaram um variado espectro de atividades farmacológicas *in sílico*, em especial, o efeito anti-inflamatório e antineoplásica.

E que o óleo essencial de *Rhaphiodon echinus* é eficaz contra as cepas de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, sendo assim, mais estudos são necessários para desvendar o mecanismo de ação da atividade antifúngica deste produto natural.

## ANEXO 1

### *Instruções aos Autores*

3.3 Nos casos de inadequação das línguas portuguesa, espanhola ou inglesa, uma revisão técnica por um especialista será solicitada aos autores.

3.4 A Equipe Editorial e os Editores Associados decidirão sobre a aceitação do trabalho, podendo, inclusive, devolvê-lo aos autores com sugestões para que sejam feitas as modificações necessárias no texto e/ou ilustrações. Neste caso, é solicitado ao(s) autor(es) o envio da versão revisada contendo as devidas alterações ou justificativas. Esta nova versão do trabalho será reavaliada pelo Corpo de Editores.

3.5 Nos casos em que o artigo for rejeitado por um dos dois revisores, a Equipe Editorial e os Editores Associados decidirão sobre o envio do mesmo para a análise de um terceiro revisor.

3.6 Nos casos de dúvida sobre a análise estatística esta será avaliada pela estatística consultora da revista.

3.7 Após aprovação quanto ao mérito científico, os artigos serão submetidos à análise final somente da língua portuguesa (revisão técnica) por um profissional da área.

#### **4 Correção das Provas dos Artigos**

4.1 A prova dos artigos será enviada ao autor correspondente por meio de e-mail com um link para baixar o artigo diagramado em PDF para aprovação final.

4.2 O(s) autor(es) dispõe de um prazo de 72 horas para correção e devolução do original devidamente revisado, se necessário.

4.3 Se não houver retorno da prova em 72 horas, o Corpo de Editores considerará como final a versão sem alterações, e não serão permitidas maiores modificações. Apenas pequenas modificações, como correções de ortografia e verificação das ilustrações serão aceitas. Modificações extensas implicarão na reapreciação pelos revisores e atraso na publicação do artigo.

4.4 A inclusão de novos autores não é permitida nessa fase do processo de publicação.

#### **5 Submissão dos Artigos**

Os artigos deverão ser submetidos on line ([www.archhealthinvestigation.com.br](http://www.archhealthinvestigation.com.br)). Todos os textos deverão vir acompanhados obrigatoriamente da “Carta de Submissão”, do “Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição” (quando cabível), bem como da “Declaração de Responsabilidade”, da “Transferência de Direitos Autorais” e “Declaração de Conflito de Interesse” (documento explicitando presença ou não de conflito de interesse que possa interferir na imparcialidade do trabalho científico) assinado(s) pelo(s) autor(es). O manuscrito deverá ser enviado em dois arquivos Word, onde um deles deve conter o título do trabalho e respectivos autores; o outro deverá conter o título (português, espanhol e inglês), resumo (português, espanhol e inglês) e o texto do trabalho (artigo completo sem a identificação dos autores).

##### 5.1 Preparação do Artigo

O texto, incluindo resumo, tabelas, figuras e referências, deverá estar digitado no formato “Word for Windows”, fonte “Arial”, tamanho 11, espaço duplo, margens laterais de 3 cm, superior e inferior com 2,5 cm e conter um total de 20 laudas, incluindo as figuras, tabelas e referências. Todas as páginas deverão estar numeradas a partir da página de identificação.

##### 5.1.1 Página de identificação

A página de identificação deverá conter as seguintes informações:

- título em português, espanhol e inglês, os quais devem ser concisos e refletirem o objetivo do estudo.
- nome por extenso dos autores, com destaque para o sobrenome e na ordem a ser publicado, contendo nome do departamento e da instituição aos quais são afiliados, com a respectiva sigla da instituição, CEP (Código de Endereçamento Postal), cidade e país (Exemplo: Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, Faculdade de Odontologia, UNESP Univ. Estadual Paulista, 14801-903 Araçatuba - SP, Brasil);
- Endereço completo do autor correspondente, a quem todas as correspondências devem ser endereçadas, incluindo e-mail.

##### 5.1.2 Resumo

Todos os tipos de artigos deverão conter resumo (português, espanhol e inglês) precedendo o texto, com no máximo de 250 palavras, estruturado em sessões: introdução, objetivo, material e método, resultados e conclusão. Nenhuma abreviação ou referências deverão estar presentes.

##### 5.1.3 Descritores

Indicar, em número de 3 a 6, identificando o conteúdo do artigo, devendo ser mencionadas logo após o RESUMO. Para a seleção dos Descritores os autores deverão consultar a lista de assuntos do “MeSH Data

Base (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh>)” e os Descritores em Ciências da Saúde – DeCS (<http://decs.bvs.br/>). Deve-se utilizar ponto e vírgula para separar os descritores, que devem ter a primeira letra da primeira palavra em letra maiúscula.

#### 5.1.4 Ilustrações e tabelas

As ilustrações (figuras, gráficos, desenhos, etc.), serão consideradas no texto como figuras, sendo limitadas ao mínimo indispensáveis e devem ser adicionadas em arquivos separados. Devem ser numeradas consecutivamente em algarismos arábicos segundo a ordem em que aparecem no texto. As figuras deverão ser anexadas ao e-mail do artigo, em cores originais, digitalizadas em formato tif, gif ou jpg, com no mínimo de 300dpi de resolução, 86 mm (tamanho da coluna) ou 180 mm (tamanho página inteira). As legendas correspondentes deverão ser claras, concisas e listadas no final do trabalho. As tabelas deverão ser logicamente organizadas e numeradas consecutivamente em algarismos arábicos. A legenda deve ser colocada na parte superior das mesmas. As tabelas deverão ser abertas nas laterais (direita e esquerda). As notas de rodapé deverão ser indicadas por asteriscos e restritas ao mínimo indispensável

#### 5.1.5 Citação de autores no texto

A citação dos autores no texto poderá ser feita de duas formas:

##### 5.1.5.1 Somente numérica:

*Exemplo:* Radiograficamente é comum observar o padrão de “escada”, caracterizado por uma radiolucidez entre os ápices dos dentes e a borda inferior da mandíbula.<sup>6,10,11,13</sup>. As referências devem ser citadas no parágrafo de forma sobrescrita e em ordem ascendente.

##### 5.1.5.2 Ou alfanumérica:

- um autor: Ginnan<sup>4</sup> (2006)
- dois autores: Tunga, Bodrumlu<sup>13</sup> (2006)
- três autores ou mais de três autores: Shipper et al.<sup>2</sup> (2004)

*Exemplo:* As técnicas de obturação utilizadas nos estudos abordados não demonstraram ter tido influência sobre os resultados obtidos, segundo Shipper et al.<sup>2</sup> (2004) e Biggs et al.<sup>5</sup> (2006). Shipper et al.<sup>2</sup> (2004), Tunga, Bodrumlu<sup>13</sup> (2006) e Wedding et al.<sup>18</sup> (2007),

#### 5.1.6 Referências

As Referências deverão obedecer seguir aos requisitos “Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journals – Vancouver”, para a submissão de manuscritos artigos a revistas biomédicas disponível em: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html). Toda referência deverá ser citada no texto. Deverão ser ordenadas pelo sobrenome dos autores e numeradas na mesma sequência em que aparecem no texto.

Exemplo - Texto:

... de acordo com Veríssimo et al.<sup>1</sup>, Raina et al.<sup>2</sup>, Stratton et al.<sup>3</sup>, Bodrumlu et al.<sup>4</sup> e Odonni et al.<sup>5</sup>, contrariando os resultados apresentados por Baumgartner et al.<sup>6</sup> onde ...

Referências:

1. Veríssimo DM, Do Vale MS, Monteiro AJ. Comparison of apical leakage between canals filled with gutta-percha/AH plus and the Resilon/Epiphany system, when submitted to two filling techniques. J Endod. 2007;33:291-4.
2. Raina R, Loushine RJ, Wellwe RN, Tay FR, Pashjey DHP. Evaluation of the quality of the apical seal in Resilon/Epiphany and gutta-percha/AH plus-filled root canals by using a fluid filtration approach. J Endod. 2007;33:944-7.
3. Stratton RK, Apicella MJ, Mines P. A fluid filtration comparison of gutta-percha versus Resilon, a new soft resin endodontic obturation system. J Endod. 2006;32:642-5.
4. Bodrumlu E, Tunga U, Alaçam T. Influence of immediate and delayed post space preparation on sealing ability of Resilon. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2007;103:61-4.
5. Odonni PG, Mello I, Coil JM, Antoniazzi JB. Coronal and apical leakage analysis of two different root canal obturation systems. Braz Oral Res. 2008;22:211-5.
6. Baumgartner G, Zehnder M, Paquè F. Enterococcus faecalis type strain leakage through root canals filled with guttapercha/ AH plus or Resilon/Epiphany. J Endod. 2007;33:45-7.

Referência a comunicação pessoal, trabalhos em andamento e submetidos à publicação não deverão constar da listagem de referências. Quando essenciais essas citações deverão ser registradas no rodapé da página do texto onde são mencionadas.

Publicações com até seis autores, citam-se todos, separando um do outro com vírgula; acima de seis autores, citam-se os seis primeiros, separando um do outro com vírgula, seguido da expressão et al.

Exemplo

- seis autores:  
Dultra F, Barroso JM, Carrasco LD, Capelli A, Guerisoli M, Pécora JD.
- Mais de 6 autores

Pasqualini D, Scotti N, Mollo L, Berutti E, Angelini E, Migliaretti G, et al.

Exemplos de referências

- Livro

Brunetti RF, Montenegro FLB. Odontogeriatrics: noções de interesse clínico. São Paulo: Artes Médicas; 2002.

Gold MR, Siegal JE, Russell LB, Weintin MC, editors. Cost-effectiveness in health and medicine.

Oxford, England: Oxford University Press; 1997. p. 214-21.

- Organização ou Sociedade como autor de livro

American Dental Association. Guide to dental materials and devices. 7th ed. Chicago: American Dental Association; 1974.

- Documentos legais

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 79 de 28 de agosto de 2000. DO 169 de 31/08/2000. p. 1415-537.

- Artigo de periódico

Hetem S, Scapinelli CJA. Efeitos da ciclofamida sobre o desenvolvimento do germe dental “in vitro”. Rev Odontol UNESP. 2003;32:145-54.

Os títulos dos periódicos deverão ser referidos de forma abreviada, sem negrito, itálico ou grifo, de acordo com o Journals Data Base (PubMed) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/journals>), e para os periódicos nacionais verificar em Portal de Revistas Científicas em Ciências da Saúde da Bireme (<http://portal.revistas.bvs.br/?lang=pt>).

A exatidão das referências constantes da listagem e a correta citação no texto são de responsabilidade do(s) autor(es) do artigo. Citar apenas as referências relevantes ao estudo.

## 6 Princípios Éticos e Registro de Ensaios Clínicos

### 6.1 Procedimentos experimentais em animais e humanos

*Estudo em Humanos:* Todos os trabalhos que relatam experimentos com humanos ou que utilize partes do corpo ou órgãos humanos (como dentes, sangue, fragmentos de biópsia, saliva, etc...) devem seguir os princípios éticos estabelecidos e ter documento que comprove sua aprovação por um Comitê de Ética em Pesquisa em seres Humanos (registrado na CONEP) da Instituição do autor ou da Instituição onde os sujeitos da pesquisa foram recrutados, conforme Resolução 196/96 e suas complementares do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde.

*Estudo em Animais:* Em pesquisas envolvendo experimentação animal é necessário que o protocolo tenha sido aprovado pelo Comitê de Pesquisa em Animais da Instituição do autor ou da Instituição onde os animais foram obtidos e realizado o experimento.

*Casos clínicos:* Deve-se evitar o uso de iniciais, nome e número de registro de pacientes. O uso de qualquer designação em tabelas, figuras ou fotografias que identifique o indivíduo não é permitido, a não ser que o paciente ou responsável expresse seu consentimento por escrito (em anexo modelo). O Editor Científico e o Conselho Editorial se reservam o direito de recusar artigos que não demonstrem evidência clara de que esses princípios foram seguidos ou que, ao julgamento dos mesmos, os métodos empregados não foram apropriados para o uso de humanos ou animais nos trabalhos submetidos à este periódico.

**7. Casos Omissos:** serão resolvidos pela Equipe Editorial e Editores Associados.

## 8 Apresentação dos Artigos

Os artigos originais deverão apresentar:

- **Introdução:** Explicar precisamente o problema, utilizando literatura pertinente, identificando alguma lacuna que justifique a proposição do estudo. No final da introdução deve ser estabelecida a hipótese a ser avaliada.
- **Material e método:** Deve ser apresentado com detalhes suficientes para permitir a confirmação das observações e possibilitar sua reprodução. Incluir cidade, estado e país de todos os fabricantes depois da primeira citação dos produtos, instrumentos, reagentes ou equipamentos. Métodos já publicados devem ser referenciados, exceto se modificações tenham sido feitas. No final do capítulo descrever os métodos estatísticos utilizados.
- **Resultado:** Os resultados devem ser apresentados seguindo a seqüência do Material e método, com tabelas, ilustrações, etc. Não repetir no texto todos os dados das tabelas e ilustrações, enfatizando somente as observações importantes. Utilizar o mínimo de tabelas e ilustrações possível.
- **Discussão:** Os resultados devem ser discutidos em relação à hipótese testada e à literatura (concordando ou discordando de outros estudos, explicando os resultados diferentes). Devem ser destacados os achados do estudo e não repetir dados ou informações citadas na introdução ou resultados. Relatar as limitações do estudo e sugerir estudos futuros.
- **Conclusão:** As conclusões devem ser coerentes com os objetivos, extraídas do estudo, não repetindo simplesmente os resultados.
- **Agradecimentos:** (quando houver) - agradeça pessoas que tenham contribuído de maneira significativa

para o estudo. Especifique auxílios financeiros citando o nome da organização de apoio de fomento e o número do processo.

Revisão de literatura:

**Archives of Health Investigation** só aceita revisão de literatura sistemática, com ou sem meta-análise no formato e estilo Cochrane quando aplicável. Para maiores informações consultar [www.cochrane.org](http://www.cochrane.org). As revisões de literatura deverão contemplar assuntos atuais e de relevância para a área. Existem na literatura diversos exemplos deste tipo de revisão.

### 9. Relato de casos clínicos

- Resumo (português, espanhol e inglês): Deverá conter um sumário do artigo em um único parágrafo
- Introdução: deve conter uma explicação resumida do problema citando somente referências relevantes e a proposição.
- Descrição do caso clínico: Relatar o caso, destacando o problema, os tratamentos disponíveis e o tratamento selecionado. Descrever detalhadamente o tratamento, o período de acompanhamento e os resultados obtidos. O relato deve ser realizado no tempo passado e em um único parágrafo.
- Discussão: Comentar as vantagens e desvantagens do tratamento, etc. Se o texto ficar repetitivo omitir a discussão.

### 10. Descrição de técnicas

- Resumo (português, espanhol e inglês): Deverá conter um sumário do artigo em um único parágrafo
- Introdução: Apenas um resumo da literatura relevante que colabore com a padronização da técnica ou protocolo a serem apresentados.
- Técnica: Deve ser apresentada passo a passo.
- Discussão: Comentar as vantagens e desvantagens da técnica. Indicar e contra indicar a técnica apresentada. Se o texto ficar repetitivo omitir a discussão.
- Abreviaturas, Siglas e Unidades de Medida: para unidades de medida, deverão ser utilizadas as unidades legais do Sistema Internacional de Medidas. Nomes de medicamentos e materiais registrados, bem como produtos comerciais, deverão aparecer entre parênteses, após a citação do material, e somente uma vez (na primeira).

## Termo de Consentimento

Eu, \_\_\_\_\_ responsáveis legais de \_\_\_\_\_  
autorizo a publicação dos dados e fotografias do tratamento realizado e que fará parte do artigo intitulado

\_\_\_\_\_ de autoria de \_\_\_\_\_

na **Archives of Health Investigation**.

Datar e assinar

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

## Termo de Consentimento

Eu, \_\_\_\_\_ autorizo a publicação dos dados e fotografias do  
tratamento realizado e que fará parte do artigo intitulado

\_\_\_\_\_ de autoria de

\_\_\_\_\_ na **Archives of Health Investigation**.

Datar e assinar

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

## Carta de Submissão, Responsabilidade e Transferência de Direitos Autorais

Prezado Editor,  
Encaminho o artigo intitulado

\_\_\_\_\_ de autoria \_\_\_\_\_ para análise e publicação na **Archives of Health Investigation**.

Por meio deste documento, transfiro para **Archives of Health Investigation**, os direitos autorais a ele referente(s) que tornar-se-ão propriedade exclusiva da mesma, sendo vedada qualquer reprodução total ou parcial, em qualquer outra parte ou meio de divulgação impressa, sem que a prévia e necessária autorização seja solicitada e obtida por escrito junto à Comissão Editorial da Revista.

Certifico que o manuscrito é um trabalho de pesquisa original, e o seu conteúdo não está sendo considerado para publicação em outras revistas, seja no formato impresso ou eletrônico, reservando-se os direitos autorais do mesmo para a referida revista. A versão final do trabalho foi lida e aprovada por todos

os autores. Certifico(amos) que participei(amos) suficientemente do trabalho para tornar pública minha (nossa) responsabilidade pelo seu conteúdo.

Datar e assinar

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Observação: Os co-autores, juntamente com o autor principal, devem assinar a declaração de responsabilidade acima, configurando, também, a mesma concordância dos autores do texto enviado e de sua publicação se aceito pela **Archives of Health Investigation**

### **Declaração de Inexistência de Conflito de Interesses**

Os autores abaixo assinados do manuscrito intitulado “.....” declaram à Revista **Archives of Health Investigation** a inexistência de conflito de interesses em relação ao presente artigo.

Cidade, UF, data.



## ANEXO 2

# INSIRA O TÍTULO EM PORTUGUÊS DO ESTUDO ORIGINAL

INSERT TITLE IN ENGLISH

NOME E SOBRENOME DO **AUTOR**<sup>1</sup>, NOME E SOBRENOME DO **AUTOR**<sup>1</sup>, NOME E SOBRENOME DO **AUTOR**<sup>1</sup>, NOME E SOBRENOME DO **AUTOR**<sup>1</sup>, NOME E SOBRENOME DO **AUTOR**<sup>2\*</sup>

1. Acadêmico do curso de graduação do curso X da Universidade Y; 2. Professor Doutor, Disciplina X do curso X da Universidade Y.

\* Insira o endereço do autor de correspondência com Rua/ Av. número, bairro, cidade, Estado, Brasil. CEP: 00000-000. [email@mail.com.br](mailto:email@mail.com.br)  
Preferencialmente, o orientador do estudo deverá ser designado para os diálogos com o Corpo Editorial do periódico **BJSCR**, fornecendo preferencialmente seus contatos profissionais

Recebido em xx/xx/201x. Aceito para publicação em xx/xx/201x

## RESUMO

O resumo do manuscrito, em negrito, deve ter no máximo 200 palavras. O resumo deve ressaltar o fator motivador para a redação do trabalho, sendo composto por frases simplificadas (concisas), afirmativas, sem apresentação de itens enumerados com tópicos. Deverá ser redigido em parágrafo único. Símbolos que não sejam comumente utilizados, fórmulas, equações, diagramas, entre outros, devem ser evitados.

**PALAVRAS-CHAVE:** registre de 3 a 5 palavras-chave, separadas por ponto e vírgula (;).

## ABSTRACT

O abstract, sem negrito, deve ser a tradução do resumo; assim, para evitar o retrabalho, faça o abstract apenas após ter finalizado o resumo.

**KEYWORDS:** as keywords, separadas por ponto e vírgula (;) devem ser as palavras-chave traduzidas para o inglês.

## 1. INTRODUÇÃO

Neste item, deve ser abordado o referencial teórico pesquisado para a elaboração do artigo.

Se necessário, o texto poderá ser subdividido por subtítulo(s) sugestivo(s), grafados com alinhamento à esquerda e em negrito e fonte Arial. A introdução deverá ser finalizada com a hipótese e o(s) objetivo(s) do estudo realizado, sem a necessidade de evidenciá-los em subtítulos.

Abaixo segue um modelo de parágrafo para que fique representado o modo de citação no padrão Vancouver, utilizado pelo periódico BJSCR.

Dotter & Judkins (1964)<sup>1</sup>, descreveram pela primeira vez um procedimento de angioplastia com o uso de cateter de dilatação na circulação periférica, antevendo sua aplicabilidade na circulação coronária.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2010)<sup>2</sup>, as doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo, além de contribuir significativamente com altas taxas de morbidade e elevados custos governamentais com saúde, nos dias de hoje<sup>3</sup>.

Apesar de suas limitações, é preciso considerar que os *stents* coronarianos promoveram o maior avanço da cardiologia intervencionista desde a criação da angioplastia coronariana por Andreas Grüntzig em 1979<sup>4</sup>, uma vez que propiciaram uma diminuição significativa de reestenose quando comparados com qualquer outra técnica de intervenção coronariana percutânea<sup>4,5</sup>.

Akira *et al.* (1995)<sup>6</sup> compararam a reestenose após o implante de *stents* em lesões >20 mm, encontrando índices de 24 a 39%, independentes do tipo de *stent*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os autores devem detalhar os recursos materiais e metodológicos utilizados para realização do trabalho. **Abreviaturas:** para unidades de medida, utilize somente as unidades do Sistema Internacional de Unidades (SI). Utilize apenas abreviaturas e símbolos já padronizados, evitando incluí-las no título do manuscrito e no resumo. O termo completo deve preceder a abreviatura quando ela for empregada pela primeira vez, salvo no caso de unidades comuns de medida.

### 3. RESULTADOS

Neste item os autores devem registrar seus dados numéricos. Figuras e Tabelas (se houver) deverão ser inseridas pelos autores no corpo do texto em local onde sua visualização facilite a compreensão do estudo apresentado.

- Se houver Figuras, recomenda-se que sejam coloridas, com numeração arábica progressiva. O título da figura deverá aparecer abaixo desta, seguido pela sua respectiva legenda, em fonte de tamanho 8. As figuras devem possuir resolução suficiente para visualização se a página for ampliada pelo leitor e estar no formato .JPG.

Não serão aceitas imagens fora de foco;

- Se apresentar Tabelas, o título desta deverá ser inserido sobre (acima) da Tabela, com numeração arábica progressiva, indicando, logo abaixo, a fonte da pesquisa (se houver), ou algum item de observação relevante para interpretação de seu conteúdo.

Os resultados apresentados em Tabelas não devem ser repetidos em gráficos, e vice-versa; No texto, a referência às Tabelas ou Figuras deverão ser feitas por algarismos arábicos. Note que não deverá ser feita inserção dos elementos denominando-os como: esquema, diagrama, gráfico etc. **Os elementos gráficos do artigo necessariamente deverão ser chamados de Figura ou de Tabela.**

### 4. DISCUSSÃO

Após a apresentação dos resultados, os autores deverão comentar sobre seus achados experimentais, contextualizando-os com os registros prévios na literatura científica especializada. Note que o item discussão não deve conter reapresentação de resultados, mas tão somente os comentários ou correlações entre os dados apresentados, e/ou entre os dados do estudo com a literatura especializada.

### 5. CONCLUSÃO

O(s) autor(es) deverá(ão) responder de modo afirmativo ou negativo sobre a hipótese que motivou a realização do estudo, por meio do alcance dos objetivos propostos. No último parágrafo, o(s) autor(es) poderá(ão) expressar sua contribuição reflexiva (de cunho pessoal), e/ou versar sobre as perspectivas acerca do estudo realizado. Este item não deve conter referências, pois deve expressar a opinião dos autores, com a devida fundamentação científica.

### 6. AGRADECIMENTOS ou FINANCIAMENTO

O(s) autor(es) deve(m) indicar a(s) fonte(s) de financiamento da pesquisa (agências de fomento, empresas, etc.), agradecer à instituições ou pessoas que viabilizaram o estudo, sem necessariamente apresentarem-se como autores.

### 7. REFERÊNCIAS

Os títulos de periódicos devem ser abreviados de acordo com o *Index Medicus (List of Journals Indexed in Index Medicus)*, disponível em <http://www.nlm.nih.gov>. Utilize fonte Times New Roman de tamanho 9. Listar todos os autores quando até três; quando forem quatro ou mais, listar os três primeiros, seguidos de *et al.* (em itálico). As referências são de responsabilidade dos autores e devem estar de acordo com os originais.

#### Exemplos de referências:

#### LIVROS:

- [1] Vellini-Ferreira F. Ortodontia: diagnóstico e planejamento clínico. 3ª ed. São Paulo: Artes Médicas; 1999.
- [2] Kane AB, Kumar V. Patologia ambiental e nutricional. In: Cotran RS. Robbins: patologia estrutural e funcional. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.

#### PERIÓDICOS CIENTÍFICOS:

- [1] Ong JL, Hoppe CA, Cardenas HL, *et al.* Osteoblast precursor cell activity on HA surfaces of different treatments. *J Biomed Mater Res* 1998; 39(2):176-83.

WEBSITES:

- [1] World Health Organization. Oral health survey: basic methods. 4th ed. Geneva: ORH EPID: 1997. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Imunoterapia. [acesso 11 mar. 2012] Disponível em: <http://inca.gov.br/tratamento/imunoterapia.htm>

MONOGRAFIAS, DISSERTAÇÕES E TESES:

- [2] Mutarelli OS. Estudo in vitro da deformação e fadiga de grampos circunferenciais de prótese parcial removível, fundidos em liga de cobalto-cromo e em titânio comercialmente puro. [tese] São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 2000.

ANAIS DE EVENTOS OU ENCONTROS CIENTÍFICOS:

- [3] Ribeiro A, Thylstrup A, Souza IP, Vianna R. Biofilme e atividade de cárie: sua correlação em crianças HIV+. In: 16ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica; 1999; set 8; Águas de São Pedro. São Paulo: SBPqO; 1999

