

ANDRÉ LUIS MONTEIRO ARAÚJO

**Avaliação *in vitro* da atividade de óleos essenciais sobre
Candida albicans e seus fatores de virulência**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Fátima Costa Pires

**SÃO PAULO
2015**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Araújo, André Luis Monteiro

Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica de óleos essenciais sobre *Candida albicans* - São Paulo, 2014.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2014.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientação: Maria de Fátima Costa Pires

1. *Candida albicans* 2. Óleos voláteis 3. Testes de sensibilidade microbiana.

SES/CCD/CD-305/14

Dedicatória

Dedico este trabalho à muitos:

- à minha mãe, Maria Aparecida Monteiro, pelo apoio e torcida incondicionais, além de exemplo a ser admirado, onde não bastaria um obrigado;

- à minha noiva Thais Calixto da Silva pelo companheirismo, paciência e suporte padrão “OMS (físico, mental, social e acadêmico-profissional)”.

Aproveito a oportunidade para prestar as justas dedicatórias aos mestres de microbiologia que são parte de minha formação acadêmica e profissional, os quais devo todos os méritos:

- ao primeiro mestre, minha eterna professora Dra. Maria Toshiko Funayama de Castro, por apresentar esta nobre ciência, a qual me dedico com o mesmo entusiasmo que aprendi a admirar e cujo imensurável conhecimento científico, dedicação e postura profissional servirão de inspiração sempre. Minha gratidão e admiração eterna;

- à Profa. Dra. Viviane Reis de Azevedo, por me inserir no fantástico “universo” da micologia, cuja dedicação, profissionalismo e vasto conhecimento na área me encorajou e permitiu a tornar-me um aspirante à micologista, atividade a qual, se houver alguma excelência minha em exercê-la, certamente é e será sempre reflexo do que me ensinara;

- aos mestres que tenho a honra de tê-los como colegas profissionais, Jussara da Silva Faustino, Cícero Vagner de Souza, Beatriz Pedroso Pregnoatto, Maria Cecília Bianchi Soares, Flávio Costa Sauda e Estevão de Camargo Passos - alguns professores de titulação, outros de vocação – os quais me ensinaram microbiologia, em vários de seus segmentos e valores, permitindo desenvolver-me como profissional e pessoa;

- ao Prof. Dr. Patrício Godoy Martinez e Prof. Dr. Luiz Mário Janini pelas contribuições em seus ensinamentos, que, embora em um relativamente curto período de convivência, elevaram minhas habilidades e percepções sobre esta ciência;

Muitos são os mestres e ínfimas são as oportunidades para expor a gratidão de suas contribuições; à todos ausentes das citações, porém presentes em minha vida, meus sinceros agradecimentos!

Agradecimentos

- à Orientadora Profa. Dra. Maria de Fátima Costa Pires, pela oportunidade, orientação e aprendizado propiciado;
- às colegas de curso e bancada Patrícia de Souza Santos e Maria Luisa Makabe pela convivência, assistência e paciência;
- à Profa. Dra. Claudete Rodrigues Paula, pelos isolados biológicos cedidos para esse trabalho, bem como pela honra de tê-la em minha banca de qualificação, contribuindo com seu conhecimento para meu aprendizado e aprimoramento deste trabalho;
- à Profa. Noemi Nosomi Taniwaki e Profa. Dra. Luciana da Silva Ruiz, por fazerem parte de minha banca de qualificação, onde sou grato pelas sugestões que não só contribuíram neste trabalho, mas também em meu exercício profissional;
- à empresa *World's Naturals Fragrances*®, pelos óleos essenciais gentilmente cedidos para o desenvolvimento deste trabalho;
- ao Prof. Dr. Massuo Jorge Kato da Universidade de São Paulo, pelas análises cromatográficas;
- à Diretora. Técnica geral do Instituto Adolfo Lutz, CLR Santos, Profa. Dra. Andréa Gobetti Vieira Coelho e à Diretora de Núcleo Ivy de Jesus Alves, pelo suporte e compreensão, os quais permitiram cumprir as tarefas exigidas durante o curso acadêmico;
- aos demais colegas do Instituto Adolfo Lutz os quais tenho a honra de conviver profissionalmente, cuja valorosa aprendizagem e amizade obtive neste convívio, desde os tempos de aprimoramento;
- ao Prof. Dr. Estevão de Camargo Passos, pelo incentivo, apoio e ensinamentos que certamente ajudaram meu curso acadêmico e profissional;
- aos meus familiares e amigos de longa data, pela torcida, assistência direta ou indireta, amizade, paciência e bons momentos vividos.
- aos funcionários do Núcleo de Microscopia eletrônica do Instituto Adolfo Lutz pelo suporte;
- à Secretaria da Pós Graduação, às secretárias Tirces e Caroline Coppo, pelo suporte;

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto Adolfo Lutz.

Este trabalho teve o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES. Bolsa de Mestrado.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade *in vitro* dos óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora* Hooker, *Eucalyptus globulus* Labill, *Eugenia caryophyllus* Sprengel, *Melaleuca alternifolia* Chell e *Thymus vulgaris* Linneaus sobre *C. albicans*. Em doses subinibitórias avaliar a formação de tubo germinativo e clamidoconídeo, a produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase e a produção de franjas. Foram utilizados 16 isolados e duas cepas padrão de *C. albicans*. ATCC (60193 e 900028) Para a avaliação da atividade antifúngica e obtenção da concentração fungicida mínima (CFM) utilizou-se a técnica de microdiluição em caldo, em meio RPMI 1640, com Tween-20 a 0,02%. E a confirmação da inibição em Agar Sabouraud dextrose, a 37°C por 24 hs. Para a avaliação da sensibilidade ao fluconazole e voriconazol foi utilizado o teste comercial Etest®. Todos os óleos essenciais apresentaram atividade inibitória sobre *C. albicans*. Para cada óleo essencial foram encontrados os seguintes resultados de CFM50 e CFM90: *E. citriodora* CFM50 de 87,89µg/mL e CFM90 de 175,78µg/m; *E. globulus* CFM50 de 703,12µg/mL e CFM90 de 5625µg/mL; *E. caryophyllus* CFM50 de 175,78µg/mL e CFM90 de 703,12µg/mL; *M. alternifolia* CFM50 de 1406,50µg/mL e CFM90 de 2812,50µg/mL; *T. vulgaris* CFM50 de 87,89 a 175,78µg/mL e CFM90 de 351,56µg/mL. A CIM50 para fluconazol foi de 0,125µg/mL e CFM90 de 0,5µg/mL e para voriconazol foi CIM50 de 0,012 e CFM90 de 0,016µg/mL. Com excessão do óleo essencial de *M. alternifolia*, os óleos essenciais que alteraram a produção do tubo germinativo e clamidoconídios também alteraram a produção de franjas. Todos os óleos essenciais alteraram a produção das exoenzimas proteinase e fosfolipase de *C. albicans*. Pelo exposto e nas condições desse estudo conclui-se que os óleos essenciais de *E. citriodora* e *T. vulgaris*, apresentaram atividade fungicida com as menores concentrações inibitórias em relação aos óleos essenciais de, *E. globulus* *E. caryophyllus* e *M. alternifoia* sobre *C. albicans*.

Palavras-chave: *Candida albicans*, óleos voláteis, teste de sensibilidade microbiana

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the in vitro activity of essential oils of *Eucalyptus citriodora* Hooker, *Eucalyptus globulus* Labill, *Eugenia caryophyllus* Sprengel, *Melaleuca alternifolia* Chell and *Thymus vulgaris* Linneaus on *C. albicans*. In subinibitory, doses evaluate the germ tube and clamidoconídeo formation and the production of protease, phospholipase, and exoenzyme production fringes. 16 isolates and two standard strains ATCC (60193 and 900028) of *C. albicans* were utilized. For the evaluation of the antifungal activity and obtaining the minimum fungicidal concentration (MFC) was used the technique of microdilution in RPMI 1640 with Tween-20 0.02%. In addition, the confirmation of inhibition in Sabouraud dextrose agar at 37 ° C for 24 hours. For the assessment of sensitivity to fluconazole and voriconazole Etest®, the commercial test was used. All esseciais oils showed inhibitory activity against *C. albicans*. For each essential oil the following results were found CFM50 and CFM90, CFM50 of *E. citriodora* 87,89µg/mL and CFM90 175.78 µg/mL; *E. globulus* CFM50 703,12µg/ml and CFM90 5625µg/m; *E. caryophyllus* CFM50 175,78µg/ml and CFM90 703,12µg/ml; *M. alternifolia* CFM50 1406,50µg/ml and CFM90 2812,50µg/ml and *T. vulgaris* CFM50 87,89 µg/ml and CFM90 351,56µg/ml;. The MIC50 for fluconazole was 0,125µg/mL and CFM90 of 0.5mg/mL and voriconazole MIC50 was 0.012 and the CFM90 0,016µg/mL. With the exception of *M. alternifolia* essential oil, all essential oils have altered the production of germ tube and chlamyospore and altered the production fringes. All altered the production of proteinase and phospholipase exoenzyme of *C. albicans*. For these reasons and under the conditions of this study it is concluded that the essential oils of *E. citriodora* and *T. vulgaris* showed fungicidal activity with the lowest inhibitory concentrations from the essential oils of *E. globulus* and *E. caryophyllus* *M. alternifoia* on *C. albicans*

Keywords: *Candida albicans*, volatile oils, microbial sensitivity test

ÍNDICE

RESUMO	6
ABSTRACT	7
ÍNDICE	8
LISTA DE ABREVIATURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE FIGURAS	13
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 <i>Candida albicans</i>	16
1.2 Antifúngicos sintéticos	18
1.3 Antifúngicos naturais	19
1.4 Óleos Essenciais.....	20
1.4.1 Espécies vegetais dos óleos essenciais estudados	22
2 OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo Geral.....	30
2.2 Objetivos específicos	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 <i>Candida albicans</i>	32
3.1.1 Pesquisa de tubo germinativo (Teste de Reynolds- Braude, 1956).....	32
3.1.2 Pesquisa de clamidoconídios (Microcultivo em lamina – Kreger- Van Rij, 1984).....	32
3.1.3 Produção de exoenzimas	33
3.1.4 Tipagem fenotípica.....	34
3.2 Óleos essenciais	35
3.2.1 <i>Eucalyptus citriodora</i> Hooker.....	35
3.2.2 <i>Eucalyptus globulus</i> Labill.	35
3.2.3 <i>Eugenia caryophyllus</i> Sprengel.	36
3.2.4 <i>Melaleuca alternifolia</i> Cheel.....	36
3.2.5 <i>Thymus vulgaris</i> Lin.	36
3.3 Pesquisa da atividade de óleos essenciais sobre <i>C. albicans</i>	37
3.3.1 Preparações da suspensão de leveduras.....	37

3.3.2	Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antifúngica dos óleos essenciais sobre isolados de <i>C. albicans</i> (Eloff, 1998, modificado por Polachini, 2004).....	37
3.3.2	Controles	37
3.3.3	Determinação da Concentração Fungicida Mínima.....	38
3.4	Ensaio da atividade antifúngica do fluconazol e voriconazol	38
3.4.1	Método <i>E-Test</i>[®] – Kit Comercial (AB-Biodisk, Solna, Suécia).....	38
3.5	Controles de qualidade e biossegurança	40
3.6	Considerações éticas	40
4	RESULTADOS	41
4.1	<i>Candida albicans</i>.....	42
4.1.1	Fatores de virulência.....	42
4.2	Atividade do óleo essencial de <i>Eucalyptus citriodora</i> Hooker sobre <i>C. albicans</i>	45
4.3	Atividade do óleo essencial de <i>Eucalyptus globulus</i> Labill sobre <i>C. albicans</i>	50
4.4	Atividade do óleo essencial de <i>Eugenia caryophyllus</i> Sprengel sobre <i>C. albicans</i>.....	55
4.5	Atividade do óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> Cheel sobre <i>C. albicans</i>	59
4.6	Atividade do óleo essencial de <i>Thymus vulgaris</i> Lin sobre <i>C. albicans</i>	63
4.7	Valores de CFM 50 e CFM 90 dos óleos essenciais sobre <i>C. albicans</i>	67
4.8	Sensibilidade de <i>C. albicans</i> ao fluconazol e voriconazol	68
5	DISCUSSÃO	70
6	CONCLUSÃO	90
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
8	ANEXOS.....	122

LISTA DE ABREVIATURAS

- AIDS:** Síndrome da imunodeficiência adquirida.
- ATCC:** *American Type Culture Collection.*
- °C:** graus Celsius.
- CFM:** concentração fungicida mínima.
- CFM₅₀:** CIM capaz de inibir o crescimento de 50% dos Isolados.
- CFM₉₀:** CIM capaz de inibir o crescimento de 90% dos Isolados.
- CIM:** concentração inibitória mínima.
- CLSI:** *National Committee for Clinical Laboratory Standards.*
- cm:** centímetro.
- dc:** diâmetro da colônia.
- EPC:** equipamento de proteção coletiva.
- EPI:** equipamento de proteção individual.
- et al.:** e outros.
- EUCAST:** *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.*
- g:** grama.
- HIV:** vírus da imunodeficiência humana - *Human Immunodeficiency Virus.*
- ICB - USP:** Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.
- Kg:** quilograma.
- mg:** miligramas.
- mL:** mililitro.
- mm:** milímetro.
- MOPS:** ácido 3-(N-morfino) propanosulfônico.
- MS:** Ministério da Saúde.
- NIH:** *National Institutes of Health.*
- OMS:** Organização Mundial da Saúde.
- PBS:** solução tampão fosfatada - *Phosphate Buffer Solution.*
- Pz:** índice de atividade enzimática.
- RPMI:** *Roswell Park Memorial Institute Medium.*
- SNC:** sistema nervoso central.
- UFC:** Unidade formadora de colônia
- WNF:** *World's Natural Fragrances®.*
- zd:** diâmetro do halo de degradação.
- zp:** diâmetro do halo de precipitação.
- µg:** micrograma.
- µm:** micrômetro.
- µL:** microlitro.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Critérios de interpretação de CIM para fluconazol e voriconazol (documento M27-A2 e M27S2 (CLSI 2013) **40**
- Tabela 2.** Atividade enzimática (*Pz*): produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase e morfotipos de cepas padrão de *Candida albicans*..... **43**
- Tabela 3.** Atividade enzimática (*Pz*): produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase e morfotipos de isolados de *Candida albicans*..... **43**
- Tabela 4.** Concentração Fungicida Mínima, formação de tubo germinativo e clamidoconídeo dos isolados biológicos e das cepas padrão ATCC 60193 e ATCC 90028 de *C. albicans* expostos ao óleo essencial de *E. citriodora* Hooker na dose subinibitória. **46**
- Tabela 5.** Atividade enzimática (produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase) e morfotipos dos isolados biológicos e das cepas padrão ATCC 60193 e ATCC 90028 de *C. albicans* expostos ao óleo essencial de *E. citriodora* Hooker na dose subinibitória. **48**
- Tabela 6.** Valores de CFM 50 e CFM 90 do óleo essencial de *E. citriodora* Hooker sobre cepas padrão ATCC 60193 e ATCC 90028 e isolados de *C. albicans* **49**
- Tabela 7.** Concentração Fungicida Mínima, formação de tubo germinativo e clamidoconídeo dos isolados biológicos e das cepas padrão ATCC 60193 e ATCC 90028 de *C. albicans* expostos ao óleo essencial de *E. globulos* Labill na dose subinibitória. **51**
- Tabela 8.** Atividade enzimática (produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase) e morfotipos dos isolados biológicos e das cepas padrão ATCC 60193 e ATCC 90028 de *C. albicans* expostos ao óleo essencial de *E. globulos* Labill na dose subinibitória. **53**
- Tabela 9.** Valores de CFM 50 e CFM 90 do óleo essencial de *E. globulos* Labill sobre cepas padrão ATCC 60193 e ATCC 90028 e isolados de *C. albicans*..... **54**
- Tabela 10.** Concentração Fungicida Mínima, formação de tubo germinativo e clamidoconídeo dos isolados biológicos e das cepas padrão ATCC 60193 e ATCC 90028 de *C. albicans* expostos ao óleo essencial de *Eugenia caryophyllus* Sprengel na dose subinibitória. **56**
- Tabela 11.** Atividade enzimática (produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase) e

morfotipos dos isolados biológicos e das cepas padrão ATCC 60193 e ATCC 90028 de <i>C. albicans</i> expostos ao óleo essencial de <i>Eugenia caryophyllus</i> Sprengel na dose subinibitória.	57
Tabela 12. Valores de CFM 50 e CFM 90 do óleo essencial de <i>Eugenia caryophyllus</i> Sprengel sobre cepas padrão ATCC 60193 e ATCC 90028 e isolados de <i>C. albicans</i>	58
Tabela 13. Concentração Fungicida Mínima, formação de tubo germinativ e clamidoconídeo dos isolados biológicos e das cepas padrão ATCC 60193 e ATCC 90028 de <i>C. albicans</i> expostos ao óleo essencial de <i>Melaleuca aternifolia</i> Cheel na dose subinibitória.	60
Tabela 14. Atividade enzimática (produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase) e morfotipos dos isolados biológicos e das cepas padrão ATCC 60193 e ATCC 90028 de <i>C. albicans</i> expostos ao óleo essencial de <i>Melaleuca aternifolia</i> Cheel na dose subinibitória.	61
Tabela 15. Valores de CFM 50 e CFM 90 do óleo essencial de <i>Melaleuca aternifolia</i> Cheel sobre cepas padrão ATCC 60193 e ATCC 90028 e isolados de <i>C. albicans</i>	62
Tabela 16. Concentração Fungicida Mínima, formação de tubo germinativo e clamidoconídeo dos isolados biológicos e das cepas padrão ATCC 60193 e ATCC 90028 de <i>C. albicans</i> expostos ao óleo essencial de <i>Thymus vulgaris</i> Lin na dose subinibitória.	644
Tabela 17. Atividade enzimática (produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase) e morfotipos dos isolados biológicos e das cepas padrão ATCC 60193 e ATCC 90028 de <i>C. albicans</i> expostos ao óleo essencial de <i>Thymus vulgaris</i> Lin na dose subinibitória.	65
Tabela 18. Valores de CFM 50 e CFM 90 do óleo essencial de <i>Thymus vulgaris</i> Lin sobre cepas padrão ATCC 60193 e ATCC 90028 e isolados de <i>C. albicans</i>	66
Tabela 19. Valores CIM 50 e CIM 90 dos óleos essenciais sobre <i>C. albicans</i>	67
Tabela 20. Valores da CIM para Fluconazol e Voriconazol sobre <i>C. albicans</i>	68
Tabela 21. Valores de CFM 50 e CFM 90 do Fluconazol e Voriconazol sobre sobre cepas padrão ATCC 60193 e ATCC 90028 e isolados de <i>C. albicans</i>	69

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 A e B.** *Eucalyptus citriodora* – **A:** hábito arbóreo; **B:** detalhe das folhas. ... **22**
- Figura 2 A e B.** *Eucalyptus globulus* - **A:** hábito arbóreo; **B:** detalhe das folhas..... **25**
- Figura 3 A, B e C.** *Eugenia caryophyllus* – **A:** botões florais; **B:** botões florais em processo de secagem natural; **C:** botões florais secos (cravo-da-índia)..... **26**
- Figura 4 A e B.** *Melaleuca alternifolia* - **A:** hábito arbóreo; **B:** folhas e floração..... **27**
- Figura 5 A e B.** *Thymus vulgaris* – **A:** floração; **B:** folhas e floração **28**
- Figura 6 A e B.** **A:** tubo germinativo de *C. albicans*. isolado 19. Microscopia de luz-aumento de 400X. **B:** clamidoconídios, blastoconídios e pseudohifas de *C. albicans*. Isolado 19. Microscopia de luz – aumento de 400X..... **42**
- Figura 7.** Morfotipo 7336 de *C. albicans*. Isolado 949. Código conforme modelo de Pongpaichit (1987), modificado por Hunter *et al.* (1989)..... **44**
- Figura 8 A e B.** **A:** isolado 14 após exposição ao óleo essencial de *E. citriodora* Hooker (concentração subinibitória = 351,56 µg/mL). Alteração das características micromorfológicas - aumento de 400X. **B:** isolado 938 após exposição ao óleo essencial de *E. citriodora* Hooker (concentração subinibitória = 175,78 µg/mL). Alteração das características micromorfológicas – aumento de 400X. **47**
- Figura 9 A e B.** **A:** isolado 938 antes do contato com óleo essencial de *E. citriodora* Hooker. Morfotipo 5305. **B:** isolado 938 após contato com óleo essencial de *E. citriodora* Hooker. Morfotipo 5335. **47**
- Figura 10 A e B.** **A:** isolado 14 após exposição ao óleo essencial de *E. globulus* Labill (concentração subinibitória: 2812,50 µg/mL). Alteração das características micromorfológicas - aumento de 400X. **B:** isolado 874 após exposição ao óleo essencial de *E. globulus* Labill (concentração subinibitória – 175,78 µg/mL). Alteração das características micromorfológicas - aumento de 400X. **52**
- Figura 11 A e B.** **A:** Isolado 938. Morfotipo 7305 antes do contato com óleo essencial de *E. globulus* Labill. **B:** isolado 938. Morfotipo 5344 após contato com óleo essencial de *E. globulus* Labill..... **52**
- Figura 12 A e B.** **A:** isolado 762. Morfotipo 5346 antes do contato com óleo essencial de *E. caryophyllus* Sprengel. **B:** isolado 762. Morfotipo 5335 após contato com óleo essencial de *E. caryophyllus* Sprengel..... **58**
- Figura 13 A e B.** **A:** isolado 762. Morfotipo 5346 antes do contato com óleo essencial

de <i>M. alternifolia</i> Cheel. B : isolado 762. Morfotipo 7335 após contato com óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> Cheel.....	62
Figuras 14 A e B. A - isolado 668. Morfotipo 7336 antes do contato com óleo essencial de <i>Thymus vulgaris</i> Linneaus.....	66

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Candida albicans*

O gênero *Candida* é classificado como fungo imperfeito na divisão Deuteromycotina, classe Blastomycetes, ordem *Cryptococcales* e família *Cryptococcaceae*. Caracteriza-se por ser unicelular, eucariota, heterotrófica, tendo como substância de reserva o glicogênio e reprodução por brotamento unipolar. Algumas espécies têm a propriedade de formar estruturas filamentosas como hifas e pseudohifas, sendo esta característica um obstáculo à fagocitose, principal mecanismo de defesa frente à esta levedura (Kurtzman e Fell, 2011; Lacaz *et al.*, 2002; Orsonio *et al.*, 2012).

Na maioria dos pacientes, a infecção por leveduras desse gênero é decorrente principalmente do reservatório endógeno, tais como a mucosa bucal, vaginal, esofágica e gastrointestinal (Sidrim e Rocha, 2004; Menezes e Monteiro, 2006; Wingeter *et al.*, 2007).

Entre as manifestações clínicas mais comuns têm-se infecções superficiais, limitadas ao tecido mucoso e/ou cutâneo, com quadros clínicos como as mucosites, vaginites esofagites, onicomicoses, etc. Pode ainda disseminar-se pelo sangue e sistema linfático, alcançando sítios, como coração, sistema nervoso central, fígado e pulmões (Giolo e Svidzinski, 2010; Araújo *et al.*, 2012).

Apesar de *Candida albicans* ter sido a principal espécie e a mais isolada, nos últimos anos houve um aumento do número de infecções invasivas por espécies não *albicans*, como *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis*, entre outras (Gudlaugsson, 2003; Ruiz *et al.*, 2005; Giolo e Svidzinski, 2010; Pupulin *et al.*, 2014).

O gênero *Candida* possui fatores de virulência como, capacidade de adesão e a produção de exoenzimas. Outras propriedades dessa levedura no processo patogênico é a formação de hifas e pseudohifas, como mecanismo de escape a fagocitose (Samaranayake, 1990; Gacser *et al.*, 2007). O progresso da infecção está relacionado a uma combinação de fatores como, a virulência da cepa e desordens imunológicas do hospedeiro (Furlamento-Maia *et al.*, 2008; Grubb *et al.*, 2009; Rorig e Colacite, 2009; Pupulin, 2014).

A adesão é um pré-requisito para a transformação da levedura de saprófita a patogênica. *C. albicans*, como muitos microrganismos patogênicos, possuem enzimas hidrolíticas que destroem, alteram ou prejudicam a integridade da membrana celular do hospedeiro, levando a uma disfunção ou interrupção das atividades, uma vez que as membranas contêm lipídeos e proteínas, constituindo-se em alvo do ataque enzimático (Pires, 2001; Kumar *et al*, 2006; Pupulin, 2014).

Alguns pesquisadores demonstraram que proteases ácidas produzidas por leveduras do gênero *Candida* podem estar envolvidas no processo de invasão tecidual, bem como associadas com a adesão (Grubb, 2009; Rorig *et al*, 2009).

A produção de exoenzimas reflete o grau de patogenicidade de *C. albicans*. A exoenzima fosfolipase atua na hidrólise dos fosfolipídios dando origem a lisofosfolipídios, que causam dano à célula epitelial. A exoenzima proteinase é capaz de degradar vários substratos, tais como queratina, colágeno, albumina, fibronectina, hemoglobina e proteínas da matriz extracelular (Ombrella *et al.*, 2008). Foram identificados outros componentes da parede celular de *C. albicans* com atividade mediadora da adesão ao endotélio, como proteínas semelhantes a integrina e mananas (Hostetter, 1994; Netea *et al*, 2008).

A morfotipagem baseia-se nas diferenças de produção, tamanho e textura de franjas marginais e da superfície das colônias, obtidas pela semeadura de isolados no meio ágar extrato de malte, obtendo um código com 4 dígitos (Phonpaichit *et al.*, (1987), modificado por Hunter *et al.*, 1989). Estes autores encontraram um índice de reprodutibilidade de 84% para os isolados idênticos e de 96% para o morfotipo que diferia em um character. Hunter *et al.*, (1989), sugerem que este sistema possa correlacionar um morfotipo distinto com a capacidade de virulência, onde franjas descontínuas estão presentes geralmente em isolados de infecções sistêmicas fatais.

C. albicans é um importante patógeno nosocomial estando associadas à quase 80% dessas infecções fúngica, sendo importante causa de fungemia (Almirante *et al.*, 2005; Zeichner e Pappas, 2006; Araújo *et al*, 2012). Outras espécies desse gênero são *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida stellatoidea* e *Candida tropicalis*. (Sidrim e Moreira, 2004; Hinrichsen, 2009; Macedo, 2009; Rorig *et al*, 2009; Giolo e Svidzinski, 2010). Candidemia é a quarta causa mais comum de infecção em hospitais terciários e esta ocorrência tem sido associada à longa permanência dos pacientes no hospital e a alta mortalidade (Edmond, 1999; Barberino, 2006). No Brasil, as principais espécies agentes de candidemia são *C.*

albicans, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (Colombo *et al*, 2011). Diferente dos Estados Unidos da América (EUA), onde a emergência de espécies não-*albicans* parece associada à pressão seletiva do uso de fluconazol. No Brasil, as espécies não-*albicans* mais prevalentes são sensíveis a este fármaco (Rex e Sobel; 2001; Colombo *et al*, 2011).

1.2 Antifúngicos sintéticos

Uma grande quantidade de fármacos obtida da síntese orgânica tem sido utilizada no tratamento de infecções fúngicas. Os antisépticos como tintura de iodo, violeta de genciana, ácido salicílico e benzóico, derivados sulfamídicos, quinonas e antifúngicos poliênicos como a nistatina e anfotericina têm sido amplamente utilizados nesta terapia (Cury *et al.*, 1977; Nassis *et al.*, 1989; Nascimento, 2007). Além dos azóis (cetoconazol, econazol, sulconazol, miconazol, clotrimazol, fluconazol, voriconazol), alilaminas (naftina, terbinafina), hidroxipiridona, morfolina, compostos de *selenium* e anfotericina B lipossômica (Recio *et al.*, 1989; Crissey *et al.*, 1995; Nascimento, 2007). Nas últimas décadas, as substâncias antimicrobianas representam um dos principais avanços da farmacoterapia (Gazim, 2008; Abrantes, 2013).

Apesar das indústrias farmacêuticas terem produzido uma grande variedade de diferentes antibióticos, cada vez mais tem sido observado um aumento de microrganismos resistentes aos antimicrobianos disponíveis no mercado, incentivando a procura por novas fontes de substâncias com esta atividade. Além disso, a alta incidência de infecções, principalmente em indivíduos imunocomprometidos, aumenta a importância de se encontrar compostos terapêuticos alternativos (Prashar, 2003; Gazim, 2008; Pupulin, 2014).

As infecções fúngicas são de difícil tratamento e seus agentes etiológicos têm mostrado resistência a ação de antifúngicos (Araújo *et al.*, 2004). Diversos estudos têm indicado a resistência da *C. albicans* aos azóis (Dupont, 1996; Hinrichsen, 2009) além da hepatotoxicidade e nefrotoxicidade ligados à utilização de polienos, notadamente a anfotericina B (Kauffman e Carver, 1997; Nascimento, 2007). Para evitar estes problemas, a procura por novos produtos eficientes e com baixa toxicidade

é necessária (Edwards e Filler, 1992; Graybill, 1992; Nascimento *et al.*, 2007; Grubb *et al.*, 2009).

1.3 Antifúngicos naturais

Para Sallé (1996), a maior parte dos medicamentos sintéticos têm sua origem nos componentes ativos das plantas.

O estudo inicia-se a partir de uma revisão etnofarmacológica, identificando as espécies mais utilizadas pela população, as quais apresentam atividade antifúngica; assim, vários extratos de plantas, tinturas óleos essenciais e produtos opoterápicos tem sido testados sobre leveduras, principalmente do gênero *Candida* (Araújo *et al.*, 2004; Carvalho, 2004; Polachini, 2004; Silva, 2004; Oliveira, 2005; Duarte, 2006, Lima *et al.*, 2006; Abrahão, 2007; Oliveira, *et al.*, 2007; Silva, 2007 e Costa *et al.*, 2009)

As plantas possuem composições químicas complexas, envolvendo centenas de compostos em pequenas concentrações. Essa complexidade faz com que tenham aplicação em diversas doenças, e nem sempre umas estão relacionadas com as outras; podendo uma planta servir para mais de uma enfermidade quando aplicada como fitoterápico (Polachini, 2004).

Ferreira (1998), relata ser muito comum que o extrato de uma planta medicinal seja uma mistura de substâncias. A separação em substâncias isoladas pode levar a perda do efeito farmacológico esperado.

A literatura há tempo relata a atividade antimicrobiana de extratos naturais, extraídos das mais diversas fontes, tais como: própolis, própolis verde, chá verde (*Camellia sinensis*), cacau (*Theobroma cacao*), tomilho (*Thymus vulgaris*), mamona (*Ricinus communis*), bardana (*Arctium lappa*), óleos essenciais de sálvia (*Salvia officinalis*) e capim-limão (*Cymbopogon citratus*), entre outros, sobre diferentes microrganismos (Leonardo *et al.*, 2001; Pereira *et al.*, 2004; Polachini, 2004; Lu *et al.*, 2005; Navas *et al.*, 2006; Abrahão, 2007; Oliveira, 2007; Carreto *et al.*, 2007; Silva, 2007).

Em relação aos fungos. Weckesser *et al.* (2007) avaliaram extratos de diferentes plantas, incluindo *Salvia officinalis*, assim, como Pessini *et al.* (2003) avaliaram treze extratos vegetais usados freqüentemente na medicina popular para o

tratamento de doenças infecciosas. Entre eles, o de *Eugenia uniflora* (pitanga) inibiu o desenvolvimento de algumas cepas de fungos. Carlini *et al.* (1986), Minami *et al.* (2004) e Wannissorn *et al.* (2005) mostraram a atividade antifúngica, dos componentes do *Cymbopogon citratus* (capim-limão).

Carreto *et al.* (2007) observaram que o extrato hidroalcoólico de *Mentha piperita* (hortelã-pimenta) apresentou atividade fungistática e fungicida para cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*. Navas *et al.*, (2006) observaram que o chá de *Thymus vulgaris* (10%) foi efetivo em inibir a aderência de *C. albicans* à superfície da resina acrílica.

Um estudo de Oliveira *et al.*, (2006) mostrou a importância e o potencial de extrato de própolis no tratamento da onicomicose, com uma significativa atividade fungistática *in vitro*. Nesse trabalho, observou-se que as espécies *C. albicans* e *C. parapsilosis*, duas das mais frequentemente isoladas de onicomicose, foram localizadas em uma posição intermediária no espectro de sensibilidade.

1.4 Óleos Essenciais

A denominação de óleo essencial refere-se a um complexo de substâncias naturais, extraídas de diversas partes de plantas por meio de destilação por arraste com vapor d'água, e os obtidos por expressão de pericarpos cítricos. São constituídos de numerosos compostos voláteis, com tensões de vapor elevadas, odoríferos, insolúveis em água, porém, solúveis em álcool e em vários solventes imiscíveis na água (Simões, 2005).

Os óleos essenciais constituem um dos mais importantes grupos de substâncias para as indústrias farmacêuticas, alimentícias e de cosméticos. Constituídos principalmente por substâncias de baixo peso molecular que são os monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanóides, ésteres, alcoóis, aldeídos e cetonas, normalmente são utilizados *in natura*, pois suas propriedades estão associadas a vários componentes que formam cada óleo em particular.

A principal característica é a volatilidade, diferindo dos óleos fixos, misturas de substâncias lipídicas, obtidos geralmente de sementes. Está associada a várias funções necessárias a sobrevivência do organismo vegetal em um ecossistema,

exercendo o papel fundamental na defesa contra microrganismos e predadores, como também na atração de insetos e outros agentes polinizadores (Craveiro e Queiroz, 1993; Vitti e Brito, 2003; Magalhães, 2009).

As estruturas secretoras têm se mostrado relevante para o conhecimento da anatomia vegetal, da natureza química do exsudato e do papel que desempenham no corpo do vegetal. De acordo com a família a que pertencem às diversas espécies de plantas acumulam essas substâncias voláteis em órgãos vegetais específicos: folha, flor, fruto, semente, caule, etc (Gazim *et al.*, 2008).

A atividade antimicrobiana de óleos essenciais tem sido objeto de diversas pesquisas. Estes constituem os elementos voláteis contidos em muitos vegetais e relacionados com diversas funções, como a defesa da planta contra microrganismos (Siqueira *et al.*, 2000). Relata-se que cerca de 60% dos óleos essenciais possuem propriedades antifúngicas (Gazim *et al.*, 2008).

O efeito antifúngico de óleos essenciais de muitas plantas aromáticas, a exemplo do tomilho (*Thymus vulgaris*) e do orégano (*Origanum vulgare*), tem sido descrito em vários estudos (Knoblock *et al.*, 1989; Arras e Usai, 2001). Atividade frente ao gênero *Candida* também está bem estabelecida. (Nenoff *et al.*, 1996; Suresh *et al.*, 1997). Além disso, o óleo essencial de *M. piperita* exibiu atividade inibitória sobre 48,75% das 80 cepas de *Candida* testadas (Carreto *et al.*, 2007).

Hammer *et al.* (2000) mostraram que o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (“tea tree”) foi capaz de inibir a formação de tubos germinativos por *C. albicans*. Esse estudo mostrou que produtos naturais podem ter ação sobre importantes fatores de virulência de *C. albicans*, como a capacidade de adesão à resina e produção de tubos germinativos.

Porter e Wilkins, (1999) relataram que a atividade antifúngica, especialmente contra o gênero *Candida* dos óleos essenciais ricos em isômeros de cadineno são reconhecidas em vários trabalhos. Silva *et al.* (2008) observaram inibição do crescimento das hifas e pseudohifas de *C. albicans* do óleo de *Cymbopogon citratus* sugerindo como um produto potencial para o tratamento da candidíase cutânea.

Chami *et al.* (2004) estudou o carvacrol, o principal componente fenólico de óleos de *Thymus vulgaris* e de *Origanum vulgare*, e eugenol, do óleo de cravo (*Dianthus caryophyllus*), em modelos animais, como resultado, obteve-se uma cura

microbiológica significativa, e um espectro de ação melhor na candidíase lingual ao comparado com a administração de nistatina.

Métodos de investigação *in vitro* com óleos essenciais têm sido desenvolvidos para que produzam resultados confiáveis e possam ser reproduzidos e validados. Contudo, essa tarefa tem sido dificultada pelas peculiaridades que os óleos apresentam, quais sejam: volatilidade, insolubilidade em água e complexidade, características que interferem significativamente nos resultados. Por isso, em testes de sensibilidade microbiana, deve-se levar em consideração a técnica utilizada, o meio de cultura, o(s) microrganismo(s) e o óleo essencial testado (Nascimento *et al.*, 2007).

1.4.1 Espécies vegetais dos óleos essenciais estudados

1.4.1.1 *Eucalyptus citriodora* Hooker

Eucalyptus citriodora Hooker, pertencente a Família Myrtaceae, ocorre principalmente no norte e no sul de Queensland, na Austrália, em altitudes que variam de 50 a 1000 m e de 70 a 400 m de altitude, respectivamente. *E. citriodora* (Figura 1 A e B) é uma árvore de porte médio. As árvores originárias do norte possuem casca rosada e as do sul apresentam manchas em sua casca e a copa espalhada. Crescem em vários tipos de solo, em florestas abertas com outras espécies, mas é facilmente diferenciada pelo forte cheiro de citronela de suas folhas. No Brasil, *E. citriodora* foi introduzido com outras espécies de eucalipto, com o objetivo inicial de produção da madeira. Além das aplicações na indústria de móveis e construção, no país, atualmente, o eucalipto é o mais cultivado para produção de óleo essencial. (Vitti e Brito, 2003).

Na composição do óleo do *E. citriodora* encontra-se citronelal, geraniol, cineol, isopulegol, pinenol e sesquiterpenos. Citronelal entra na composição de produtos como aromatizantes, sabonetes, cremes dentais, detergentes, balas, perfumes, desodorantes, desinfetantes, ceras, saches, inseticidas, etc (Andrade e Gomes, 2000).

O citronelal é indicado no tratamento de casos de infecções pulmonares, principalmente a tuberculose entre outras doenças respiratórias (Duarte, 2007). Também é utilizado como antifúngico, antiinflamatório nas infecções geniturinárias,

herpes zoster como antivírus e antialergênico, reumatismos, artrites cervicais, dorsais e reumáticas.



Fonte: http://www.desert-tropicals.com/Plants/Myrtaceae/Eucalyptus_citriodora.html

Figura 1 A e B. *Eucalyptus citriodora* – A: hábito arbóreo; B: detalhe das folhas.

1.4.1.2 *Eucalyptus globulus* Labill

Eucalyptus globulus Labill., pertencente a família Myrtaceae, *E. globulus* (Figura 2 A e B) é uma árvore nativa da Austrália, onde após a colonização europeia, se espalhou por quase todas as regiões tropicais e subtropicais do globo. Possui folhas alternadas, grandes, brancas e vistosas, e seu fruto é do tipo capsular. Foi à primeira espécie de eucalipto introduzida no Brasil, visando a produção de madeira (Vitti e Brito, 2003).

O início da extração de óleo ocorreu durante a Segunda Guerra Mundial, devido às dificuldades de importação deste tipo de óleo. Por ser explorado em pequena escala, uma vez que esta espécie está mais adaptada a climas frios, o óleo produzido no Brasil sofre grande concorrência com o importado da China. O rendimento em óleo essencial no Brasil varia de 1,6 a 2%, com teor de cineol de 70 a 80% (Vitti e Brito, 2003; Rocha e Santos, 2007).

No Brasil, é popularmente conhecido como: árvore – da - febre, gomeiro - azul,

comeiro – azul, eucalipto, mogno – branco, eucalipto – limão. O eucalipto é uma planta com grande importância, tanto do ponto de vista econômico, quanto medicinal (Cunha *et al.*, 2003).

Apesar das folhas de todas espécies de *Eucalyptus* terem propriedades idênticas, as do *E. globulus* possuem a preferência no uso medicinal. São ricas em tanino, onde se extrai do óleo essencial o 1,8 – cineol (ou eucaliptol), destinado a fabricação de produtos farmacêuticos, como inalantes e mucolíticos, assim como produtos de higiene bucal e para dar sabor e aromatizar medicamentos (Vitti e Brito, 2003). Altas doses de óleos essenciais podem provocar, em geral, nefrites e hematúrias. Somente a espécie de *E. globulus* pode ser utilizada internamente. Podem estar incluídos em formas farmacêuticas tais como: elixires, xaropes e loções peitorais, para combater afecções das vias respiratórias (garganta, brônquios, pulmões sinusites e rinites alérgicas), afecções gastro-hepática e da bexiga, bem como nas nevralgias e reumatismos; como anti-séptico, em lesões dérmicas, úlceras e outras enfermidades cutâneas produzidas por vírus e bactérias; como desinfetante (Zoghbi *et al.*, 2001; Akolade *et al.*, 2012).

Como protetor e fortalecedor da musculatura, ainda é pouco compreendido. O óleo de eucalipto é tônico e imunomodulador, ideal para a manipulação de produtos relacionados à recuperação muscular e prática esportiva, utilizado em forma de gel, xampu, óleo de massagem, óleo para banho, *spray* ambiente e antifúngico (Zoghbi *et al.*, 2001; Rocha e Santos, 2007; Akolade *et al.*, 2012).

Durante o verão, as árvores de eucalipto podem aparecer envoltas por uma névoa azul, provocada pelo óleo essencial que evapora de suas folhas, liberando moléculas com propriedade anti-sépticas, as quais podem ajudar a proteger contra as pragas. A expressão “as florestas azuis da Austrália” originam-se deste fenômeno (Price, 1999).



Fonte: <http://www.homeopathyandmore.com>

Figura 2 A e B. *Eucalyptus globulus* - A: hábito arbóreo; B: detalhe das folhas.

1.4.1.3 *Eugenia caryophyllus* Sprengel

Eugenia caryophyllus Sprengel., pertence a Família Myrtaceae, originária da Índia e cultivada em lugares de clima quente e úmido. A árvore de *E. caryophyllus* (Figura 3 A, B e C) pode atingir de 15 a 20 metros de altura e produz botões aromáticos conhecidos na culinária como cravo-da-índia. No Brasil, é cultivada desde São Paulo até a Bahia (Rodrigues, 2001). Os botões florais são secos a sombra e submetidos à extração do óleo essencial, ou usado apenas como especiaria na culinária (Mendes *et al*, 2012).

O rendimento em óleo, na destilação por arraste a vapor, é em torno de 16 a 18%. O óleo essencial de cravo-da-índia localiza-se, em maior quantidade, nos botões florais e nas folhas (6,6%), sendo rico em eugenol (85%). O eugenol é um dos constituintes do óleo essencial de *E. caryophyllus*, utilizado como analgésico, germicida, antisséptico e anestésico local, de uso tópico em odontologia (Rodrigues, 2001; Amiri *et al*, 2008).

O óleo essencial de *E. caryophyllus* pode apresentar outros compostos como cariofileno, humuleno, acetato de eugenila, óxido de cariofileno, aldeídos e derivados de furfural. Também utilizado como analgésico, germicida, antisséptico e anestésico

tópico em odontologia, também é utilizado na síntese de outras substâncias como a vanilina (Sousa *et al.*, 1991; Mendes *et al.*, 2012).



Fonte: http://www.terra-flor.com/produto/cravo_e e <http://natural.enternauta.com.br/plantas-medicinais/cravo-da-india-propriedades-medicinais/>

Figura 3 A, B e C. *Eugenia caryophyllus* – **A:** botões florais; **B:** botões florais em processo de secagem natural; **C:** botões florais secos (cravo-da-índia).

1.4.1.4 *Melaleuca alternifolia* Chell

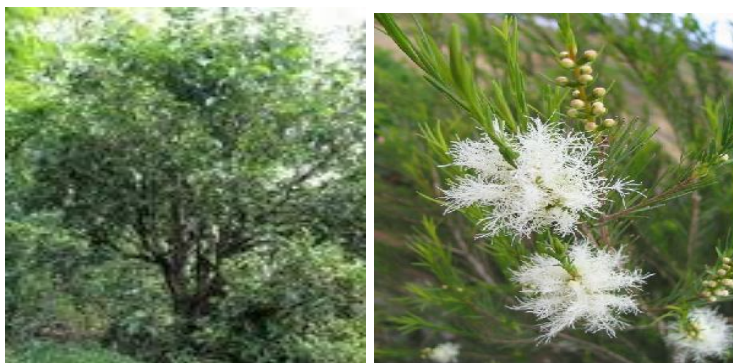
Melaleuca alternifolia Chell., (Figura 4 A e B), pertence a Família Myrtaceae, conhecida como *Tea Tree* ou árvore de chá. Originárias da Austrália, podem atingir sete metros de altura; têm uma casca fina e folhas longas e pontiagudas que, quando partidas, emitem um aroma forte. Obtido das folhas, o óleo varia de incolor ao amarelado, cotendo um aroma que lembra eucalipto. Pode conter quantidades variadas de terpenos (pineno, terpineno e cimeno), terpinenol (terpinen-4-ol), sesquiterpenos e cineol, os quais são os constituintes mais importantes relacionados à atividade antimicrobiana (Noumi *et al.*, 2010; Hammer *et al.*, 2012). O cineol é um conhecido irritante e o terpinenol é apontado como o maior contribuinte da atividade antimicrobiana dentre os componentes. O óleo de boa qualidade contém quantidades iguais ou superiores a 2 e 5% de cineol e entre 40 a 47% de terpinenol. (Simões *et al.*, 1999; Carson *et al.*, 2006; Hammer *et al.*, 2012).

A partir da destilação das suas folhas, ramos e caule é possível extrair um óleo conhecido mundialmente pelas suas características benéficas. Devido às suas qualidades curativas, o óleo de *Melaleuca* - “*Tea tree oil*” - foi usado pelas tribos aborígenes da Oceania durante anos. As folhas desta planta eram esmagadas juntamente com lama, sendo a pasta assim obtida e aplicada no tratamento de cortes

e infecções da pele (Silva *et al.*, 2002; Simões *et al.*, 1999; Hammer *et al.*, 2004).

O óleo de Melaleuca é um potente agente antisséptico, antifúngico e parasiticida natural, não tóxico e não irritante para os tecidos, muito testado clínica e laboratorialmente. O óleo de Melaleuca é reconhecidamente eficaz em inibir o crescimento de diversos tipos de microrganismos, tais como: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Aspergillus Níger*, *Streptococcus pyogenes*, dentre outros, mesmo na presença de sangue ou de material fecal (Oliveira *et al.*, 2003; Hammer *et al.*, 2004; Noumi *et al.*, 2010; Hammer *et al.*, 2012).

As propriedades antibacteriana, antifúngica e antiviral do óleo vêm da combinação de muitos compostos diferentes trabalhando juntos. Geralmente, a ação do óleo essencial é o resultado do efeito combinado de ambos os compostos ativos e inativos. Os compostos inativos podem influenciar a velocidade das reações e biodisponibilidade dos compostos ativos. (Noumi *et al.*, 2010; Emira *et al.*, 2013; Hammer *et al.*, 2012).



Fonte: <http://www.herbgarden.co.za/mountainherb>

Figura 4 A e B. *Melaleuca alternifolia* - A: hábito arbóreo; B: folhas e floração.

1.4.1.5 *Thymus vulgaris* Linneaus

Thymus vulgaris Linneaus., pertencente à Família Lamiaceae é uma pequena planta arbustiva comum de sabor e odor expressivos. Conhecido popularmente como tomilho, tomilho-de-inverno, erva-urso, timo, arçã, segurelha, tomilho-ordinário, tomilho-vulgar, poejo e tomilho-de-jardim, o *T. vulgaris* é principalmente utilizado como chá e tempero. Possui folhas pequenas, lineares ou lanceoladas, com flores róseas ou esbranquiçadas (Hudaib *et al*, 2002). Segundo Castro *et al* (2003), o tomilho produz óleo essencial com atividade inseticida, rico em carvacrol (0,07%) e timol (13 a 58%) (Figura 5 A, B e C).

Suas propriedades medicinais são: adstringente, antisséptico, diurético, expectorante, imunoestimulante, efeito antibacteriano, antifúngico e anti-helmintico para o timol e efeito bactericida para o carvacrol (Carreto *et al.*, 2007; De Lira *et al*, 2012; Ahmad *et al*, 2014).

Os principais componentes do óleo essencial de tomilho são: borneol, carvacrol, linalol, cimol, timol, taninos, flavonóides saponinas e ácidos terpênicos. O óleo essencial e extratos de folhas frescas e as flores podem ser utilizadas como aditivos aromáticos em alimentos, produtos farmacêuticos e cosméticos. *T. vulgaris* é antiespasmódico, carminativo, expectorante e sedativo. Na forma de extrato ou infuso, é utilizado para inflamações de laringe e brônquios, incluindo bronquite aguda, laringite, coqueluche, assim como também para gastrite crônica (Klaric *et al.*, 2006; Behnia *et al.*, 2008; Jakiemiu, 2008; Silva *et al.*, 2010; Ahmad *et al*, 2014).



Fonte: http://gardening.wikia.com/wiki/Thymus_vulgaris

Figura 5 A e B. *Thymus vulgaris* – A: floração; B: folhas e floração.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar *in vitro* a atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus globulus*, *Eugenia caryophyllus*, *Melaleuca alternifolia* e *Thymus vulgaris* sobre *Candida albicans*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar *in vitro* a atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus globulus*, *Eugenia caryophyllus*, *Melaleuca alternifolia* e *Thymus vulgaris* sobre *C.albicans*;
- Determinar as concentrações fungicidas mínimas dos óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus globulus*, *Eugenia caryophyllus*, *Melaleuca alternifolia* e *Thymus vulgaris* sobre *C.albicans*;
- Avaliar e comparar a formação de tubo germinativo e clamidoconídios, bem como a produção de franjas, em cepas e isolados de *C. albicans* antes e após contato com os diferentes óleos essenciais;
- Determinar e comparar a produção das exoenzimas proteinase e fosfolipase em cepas e isolados de *C. albicans*, antes e após contato com os diferentes óleos essenciais;
- Avaliar *in vitro* a sensibilidade dos isolados de *C. albicans* frente aos antifúngicos fluconazol e voriconazol.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 *Candida albicans*

Foram utilizados duas cepas-padrão ATCC (ATCC 60193 e ATCC 90028) e 16 isolados biológicos de origem humana (ICB 14,18, 660, 668, 686,726, 874, 938, 947, 949, 954, 973, 982, 993, 1009 e 1026), mantidos na Faculdade de Odontologia Disciplina de Estomatologia da Universidade de São Paulo (FO-USP).

Todos os isolados foram mantidos em ágar Sabouraud Dextrose (Difco – USA). Embora previamente identificadas como *C. albicans* estas foram reidentificadas utilizando-se as provas para pesquisa de tubo germinativo (teste de Reynolds – Braude), cultivo em lâmina, testes para assimilação de fontes de carbono e nitrogênio e teste de fermentação de açúcares, descritos segundo a técnica de Kreger van Rij (1984), Kurtzmann & Fell (2011) e conforme o protocolo utilizado para a identificação de leveduras (Anexo 2).

3.1.1 Pesquisa de tubo germinativo (Teste de Reynolds- Braude, 1956)

Leveduras com 24 horas de crescimento em ágar Sabouraud dextrose (Difco) - acrescido de 200µg/mL cloranfenicol foram semeadas em tubos de ensaio contendo 1mL de soro fetal bovino (Gibco) e incubadas a 37°C por até 3 horas. A pesquisa da formação de tubo germinativo foi observada a cada hora por até 3 horas no microscópio de luz.

3.1.2 Pesquisa de clamidoconídios (Microcultivo em lamina – Kreger- Van Rij, 1984)

O meio composto por 17,0g de Ágar “Corn-meal (*Difco*)” acrescido de 2,8g Tween 80 (*BBL*) e 1000mL de água destilada (Lacaz, 2002), foi esterilizado em autoclave a 120°C por 15 minutos. No momento do uso, volume de 3mL foi distribuído em lâminas de microscopia. As leveduras cultivadas anteriormente em ágar Sabouraud-dextrose (*Difco*) por 24 horas foram semeadas em estrias nesta lâmina, e recobertas com lamínula estéril. Essa preparação foi colocada em câmara úmida por até cinco dias, mantida a 25°C, para observação da produção de filamentação e de

clamidoconídeos, sendo as leituras realizadas diariamente.

3.1.3 Produção de exoenzimas

3.1.3.1 Proteinase (Rüchel *et al.*, 1982)

A produção de proteinase foi avaliada antes e após contato com os óleos essenciais utilizando a técnica descrita por Ruchel *et al.*, (1982) composto por: Meio base - com 18,0g de ágar (Difco) e 900,0mL água destilada. Este meio foi autoclavado a 120°C por 15 minutos. Meio de albumina: 11,7g de *yeast carbon base* (Difco), 2,0g de albumina bovina fração V (Sigma) 2,5mL de protovit (manipulado por Farmácia Bueno Ayres, SP-Brasil) e 100,0mL de água destilada. Este meio foi esterilizado por filtração em membranas Milipore de 0,22µm. O meio básico esterilizado foi resfriado a 50°C, adicionando-se o meio de albumina e em seguida a mistura foi distribuída em placas de Petri em volume de 20mL. Após a solidificação da mistura, foram semeados quatro isolados de leveduras por placa. As placas foram incubadas a 37°C por quatro dias.

A atividade enzimática da proteinase foi observada pela formação de um halo de precipitação ao redor da colônia (PZ). PZ é igual á razão entre o diâmetro da colônia (dc) e o diâmetro da colônia (dc) + diâmetro de degradação (zd) $PZ = dc/dc + zd$. Os resultados foram classificados de acordo com Price *et al.*, 1982:

Índice 1 - $Pz = 1,0$ = Ausência de atividade enzimática

Índice 2 - $0,64 \leq Pz < 1,0$ = Atividade enzimática positiva

Índice 3 - $Pz < 0,64$ = Atividade fortemente positiva

3.1.3.2 Fosfolipase (Price *et al.*, 1982)

A produção de fosfolipase foi avaliada antes e após contato com o os óleos essenciais utilizando a técnica descrita por Price *et al.*, (1982). Meio de emulsão de ovo: 80,0g de gema de ovo e 80,0mL de solução fisiológica. Os ovos foram deixados em álcool a 70% durante uma hora para serem desinfetados. Em seguida as gemas foram separadas e colocadas em um recipiente estéril contendo pérolas de vidros, pesadas e adicionadas à solução salina 0,9%, agitando-se em vortex. Meio ágar

fosfolipase: 10,00g de peptona (*Difco*); 20,00g de glicose (*Synth*); 53,30g de cloreto de sódio (*Reagen*); 0,55g de cloreto de cálcio (*Reagen*); 20,00g de ágar (*Difco*) e 1000,00mL de água destilada. O meio foi autoclavado a 120°C por 15 minutos. Ao ágar resfriado a 50°C foi adicionada uma emulsão de ovo. Volume de 20mL foi distribuído em placas de Petri. Após a solidificação da mistura, foram semeados quatro isolados de leveduras por placa. Estas placas foram incubadas a 37°C por quatro dias.

A atividade enzimática da fosfolipase foi observada pela formação de um halo de precipitação ao redor da colônia (PZ). PZ é igual à razão entre o diâmetro da colônia (dc) e o diâmetro da colônia (dc) + diâmetro de precipitação (zp) $PZ = \frac{dc}{dc + zp}$. Os resultados foram classificados de acordo com Price *et al.*, 1982:

Índice 1 - $Pz = 1,0$ = Ausência de atividade enzimática

Índice 2 - $0,64 \leq Pz < 1,0$ = Atividade enzimática positiva

Índice 3 - $Pz < 0,64$ = Atividade fortemente positiva

3.1.4 Tipagem fenotípica

A tipagem fenotípica foi avaliada antes e após contato com os os óleos essenciais utilizando a técnica descrita por Phongpaichit *et al.*, (1987) e Hunter *et al.*, (1989): O meio de cultura é o ágar extrato de malte assim constituído - 60,0g de extrato de malte, (Merck), 20,0g de ágar (*Difco*) e 1000.0mL de água destilada. O meio foi esterilizado a 120°C por 20 minutos e distribuído em placas de Petri (20mL em cada placa). As suspensões de leveduras cultivadas por 48 hs em ágar Sabouraud dextrose (*Difco*) foram preparadas em solução fisiológica 0,85%, com turvação correspondente a escala 3 de McFarland. Com o auxílio de swabs estéreis, as suspensões de leveduras foram semeadas em número de três a quatro por placa e incubadas a 25°C por 10 dias.

Os resultados foram avaliados segundo os aspectos macromorfológicos da franja e superfície das colônias de tal modo que resulte em um biotipo composto por quatro dígitos, de acordo com o modelo de tipificação de Hunter *et al.*, (1989). 1º Franja – distribuição: Ausente (0); Descontínua (>20% da margem) (1); Descontínua (21 a 50% da margem) (2); Descontínua (51 a 90% da margem) (3); Contínua, somente na periferia ou fios conspícuos em leques (5); Contínuas com filamentos paralelos (7). 2º Franja- comprimento: Ausente (0); Igual ou menor do que 2mm (2), De 3 a 5 mm (3); Igual ou maior do que 6 mm (5). 3º Franja – Textura: Ausente (0);

Muito grosseira (1); Intermediária (3); Fina (4). 4º Superfície – Topografia: Lisa (0); Nodular (1); Escavada (2); Crateriforme (4); Crateriforme com dobras e pregas (5); Dobras ou pregas (6); Pelos (8).

Após contato com o óleo essencial a pesquisa de tubo germinativo, clamidoconídeo, produção das exoenzimas e tipagem fenotípica foram realizadas nas concentrações sub-inibitórias das cepas padrão de *C. albicans* e de cada isolado testado. Como controle, isolados sem o contato com o óleo essencial foram avaliados simultaneamente.

3.2 Óleos essenciais

Nesta pesquisa, foram avaliados os óleos essenciais comerciais de *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus globulus*, *Eugenia caryophyllus*, *Melaleuca alternifolia*, e *Thymus vulgaris*, cedidos pela empresa *World's Natural Fragrances*®. Todos os óleos essenciais foram mantidos em frasco âmbar à temperatura ambiente.

As análises cromatográficas foram realizadas pelo Prof. Dr. Massuo Jorge Kato do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (Anexos 3, 4, 5, 6 e 7)

3.2.1 *Eucalyptus citriodora* Hooker.

O óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* foi extraído da folhagem, por destilação a vapor d'água, com rendimento de 1,5g de óleo por kg da planta. Seu aspecto é de líquido límpido, com coloração amarelo a amarelo-esverdeado. Farmacologicamente é composto por aldeídos (55-70%), alcoóis monoterpenos (20-25%), ésteres (< 5%), sesquiterpenos (< 5%), alcoóis sesquiterpênicos (3%), monoterpenos (< 3%) e óxidos (< 1%). A cromatografia do óleo essencial de *E. citriodora* indica, como seus principais compostos químicos, o citronelal (93,99%) e β -citronelol (2,29%). (Anexo 3).

3.2.2 *Eucalyptus globulus* Labill.

O óleo essencial de *Eucalyptus globulus* foi extraído da folhagem nova, por destilação a vapor d'água, com rendimento de 8 a 20g de óleo por kg da planta. Seu aspecto é transparente e incolor. Farmacologicamente é formado por cetonas (<01%),

aldeídos (<01%), alcoóis monoterpênicos (0,3%), ésteres (03%), sesquiterpenos (01%), alcoóis sesquiterpênicos (01-03%), álcoois monoterpênicos (03%), monoterpênicos (15-20%) e óxidos (60-75%). A cromatografia do óleo essencial de *E. globulus* indica como seus principais compostos químicos o eucaliptol (80,50%) e limoneno (14,03%). (Anexo 4)

3.2.3 *Eugenia caryophyllus* Sprengel.

O óleo essencial de *Eugenia caryophyllus* foi extraído de folhas e botões, por destilação a vapor d'água, com rendimento de 15g de óleo por kg da planta. Seu aspecto é de cor de caramelo claro ao escuro. Farmacologicamente é formado por ácidos (traços), éteres (01%), ésteres (08%), sesquiterpenos (10%) e fenóis (75 – 85%). A cromatografia do óleo essencial de *E. caryophyllus* indica como seus principais compostos químicos o eugenol (84,10%) e β -citronelol (12,67%). (Anexo 5)

3.2.4 *Melaleuca alternifolia* Cheel.

O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* foi extraído da folhagem, por destilação a vapor d'água, com rendimento de 20g de óleo por kg da planta. Seu aspecto é de coloração claro transparente, com ínfimo verde. Farmacologicamente é formado por sesquiterpenos (5-10%), óxidos (05-15%), álcoois sesquiterpênicos (<01%), álcoois monoterpênicos (25-40%), monoterpênicos (30-40%) e fenóis (<01%%). A cromatografia do óleo essencial de *M. alternifolia* indica como seus principais compostos químicos o 4- terpineol (77,15%) e γ -terpineol (7,24%). (Anexo 6).

3.2.5 *Thymus vulgaris* Lin.

O óleo essencial de *Thymus vulgaris* foi extraído das partes aéreas e flores, por destilação a vapor d'água, com rendimento de 4g de óleo por kg da planta. Seu aspecto é de óleo fino e transparente. Farmacologicamente é composto por cetonas (<01%), éteres (<2%), sesquiterpenos (<02%), óxidos (02%), álcoois sesquiterpênicos (07%), monoterpênicos (17-45%) e fenóis (40-55%). A cromatografia do óleo essencial de *T. vulgaris* indica como seus principais compostos químicos o cimeno (14,43%) e

timol (62,13%). (Anexo 7).

3.3 Pesquisa da atividade de óleos essenciais sobre *C. albicans*

3.3.1 Preparações da suspensão de leveduras

Os isolados e as cepas padrão de *C. albicans* foram cultivados em ágar Sabouraud Dextrose (Difco – USA) e incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. A suspensão dos isolados e das cepas padrão de *C. albicans* foram preparados a partir de uma cultura de 24 horas, com turbidez equivalente à escala 0,5 de Mc Farland, concentração equivalente a $1-5 \times 10^6$ UFC/mL – (Unidade Formadora de Colônia) (Pfaller *et al.*, 1988). A um mL desta suspensão em PBS pH 7.2 acrescentou-se 9 mL do meio de cultivo RPMI-1640 (Gibco BRL,Grand Island,NY,USA) ajustando-se a suspensão final para $0,5-2,5 \times 10^5$ UFC /mL. Como tensoativo utilizou-se *Tween 20* (monolaurato de polioxietilenosorbitan), da empresa *Sigma-Aldrich*[®], na concentração 0.02% (Nascimento *et al* (2007).

3.3.2 Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica dos óleos essenciais sobre isolados de *C. albicans* (Eloff, 1998, modificado por Polachini, 2004)

Os ensaios, foram realizados em microplacas, de fundo chato, com 96 poços e capacidade de 300µl. Em cada poço foi colocado uma solução de 100µL de meio RPMI- 1640 (Gibco BRL,Grand Island,NY,USA) acrescido do tensoativo, até o 12º poço. No primeiro poço foi colocado 100µL do óleo essencial a ser testado a partir de 90.000µg/mL (100%). A partir do segundo poço, 100µl do mesmo produto foi homogeneizado e diluído em série, na “base 2” até 12º poço. Na sequência foram distribuídos em cada poço 100µL da suspensão da levedura de cada amostra. As placas foram seladas com “*Parafilm M*[®]” e incubadas em estufa a 37°C por 24 horas.

3.3.2 Controles

Em uma placa de microdiluição, foi utilizado: um controle negativo, para

verificar a esterilidade do meio RPMI -1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), um controle negativo do tensoativo um controle negativo para o óleo essencial e um controle positivo para cada levedura (meio + inoculo). Esta placa também foi selada com Parafilm "M"® e incubada em estufa a 37°C por 24 horas.

3.3.3 Determinação da Concentração Fungicida Mínima

3.3.3.1 Avaliação da atividade fungistática e fungicida dos óleos essenciais

A concentração fungicida mínima CFM é considerada como a menor concentração da substância capaz de levar a morte o fungo (Cury,1997), após 24 horas.

A avaliação das atividades fungistática ou fungicida dos óleos essenciais foi realizada em placas de Petri com ágar Sabouraud Dextrose (Difco), semeando-se 5µl de todas as diluições da microplata. As placas de Petri com os inoculos foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas.

Os resultados de concentrações fungicidas mínimas (CFM) obtidos foram analisados segundo variação dos valores de CFM: para cada óleo essencial:

- CFM-50 representa a concentração fungicida mínima da substância capaz de inibir o crescimento de 50% das amostras testadas.
- CFM-90 representa a concentração fungicida mínima da substância capaz de inibir o crescimento de 90% das amostras testadas.

3.4 Ensaio da atividade antifúngica do fluconazol e voriconazol

3.4.1 Método *E-Test*® – Kit Comercial (AB-Biodisk, Solna, Suécia)

Este método foi utilizado na pesquisa de sensibilidade aos antifúngicos: fluconazol e voriconazol.

3.4.1.1 Meio de Cultivo

O meio RPMI – ágar (20,8g de RPMI-ágar-1640 (Gibco) acrescido de 2% de

glicose e 1000,0 mL de água deionizada) foi ajustado para pH 7,0 com MOPS, Após esterilização por filtração, o meio foi distribuído em tubos, em volume de 25 mL e mantidos a 4°C até o momento do uso.

3.4.1.1 Fitas E-Test®

As fitas foram adquiridas da PROBAC. A faixa de Concentração inibitória mínima (CIM) foi de 0.002 a 32 µg/mL para voriconazol e de 0.016 a 256 µg/mL para fluconazol. As tiras de E-Test® foram armazenadas em freezer a -20°C até serem utilizadas.

3.4.1.2 Preparo do Inóculo

As leveduras foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrose (Difco) por 24 horas a 35°C. A suspensão foi preparada em 1 mL de solução de NaCl 0.85% e a densidade celular com turbidez equivalente à escala 05 de Mc Farland.

3.4.1.3 Determinação da concentração inibitória mínima

Os frascos contendo 25 mL de ágar dextrose foram fundidos, resfriados a 50°C e adicionados de 25 mL do meio de ágar RPMI-1640. A mistura homogeneizada contendo 50 mL foi vertida em placa de Petri esterilizada (15 mm × 15 mm). Após solidificação do meio as placas foram estocadas a 4°C. Antes da inoculação, as placas de ágar RPMI-1640 e as fitas de E-Test® foram mantidas por 30 minutos, a temperatura ambiente. Um volume de 0,6 mL referente a cada inóculo foi distribuído homogeneamente com o auxílio de *swab* sobre a superfície do ágar e as placas deixadas à temperatura ambiente por 15 minutos para completa absorção da suspensão pelo ágar. Decorrido este tempo, as fitas de E-Test® foram cuidadosamente colocadas sobre a superfície do ágar. As placas foram mantidas a 35°C durante 24 horas.

3.4.1.4 Determinação e interpretação do teste

Após incubação, realizaram-se leituras em 24h e 48h; o valor de CIM foi obtido no ponto de intersecção entre o halo e a fita. Interpretações sobre sensibilidade ou resistência foram realizadas de acordo com os valores discriminados no protocolo preconizado pela *CLSI* (documento M27-A2 e M27S2), 2013 dispostos na tabela a seguir:

Tabela 1. Critérios de interpretação de CIM para fluconazol e voriconazol (documento M27-A2 e M27S2 (CLSI 2013))

Antifúngico / sensibilidade	Critérios de interpretação de CIM ($\mu\text{g/mL}$)		
	Susceptível (S)	Intermediário ou Sensibilidade dose independente (SDD)	Resistente (R)
Fluconazol (0,016-256 μg)	8	16-32	≥ 64
Voriconazol (0,002-32 μg)	1	2	4

* Para Voriconazol foram classificados CIMs $\leq 1\mu\text{g/mL}$ como (S) e acima de $4\mu\text{g/mL}$ (R) de acordo com o suplemento M27-S2 da CLSI (CLSI, 2013).

3.5 Controles de qualidade e biossegurança

Durante a realização do projeto até a fase dos testes foram seguidas e respeitadas todas as normas de Biossegurança. Todas as preparações e análises foram realizadas pelos mesmos técnicos utilizando-se os equipamentos de proteção individual (EPIs) como luvas, avental, máscara, óculos e equipamentos de proteção coletiva como cabine de segurança biológica, bico de Bunsen e capela de exaustão. (CDC, 1999).

3.6 Considerações éticas

Este trabalho seguiu as recomendações da resolução 466/12, submetido a análise e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz.

4 RESULTADOS

4.1 *Candida albicans*

Os 16 isolados de leveduras foram reidentificados como *Candida albicans*, 100% (16/16) apresentaram tubo germinativo e clamidoconídeos (Figura 6 A e B).

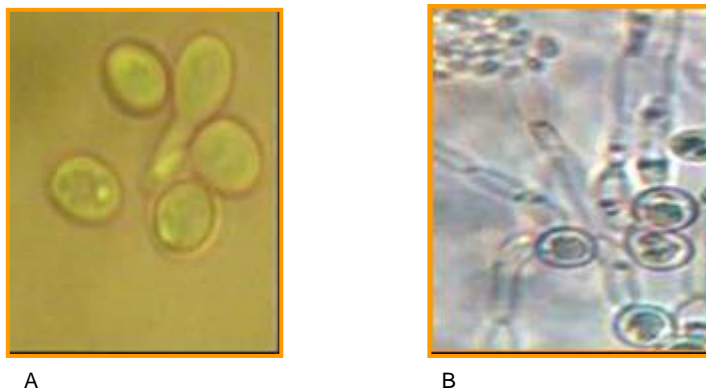


Figura 6 A e B. **A:** Tubo germinativo - Cepa-padrão de *C. albicans* ATCC 90024 - Microscopia de luz-aumento 400X.
B: Clamidoconídeo, Blastoconídeos e pseudohifas/hifas - isolado 19 de *C. albicans* Microscopia de luz – aumento 400X

4.1.1 Fatores de virulência

4.1.1.1 Atividade enzimática e Morfotipos

Na tabela 2 observa-se a produção de proteinase e fosfolipase e os morfotipos de cepas padrão de *C. albicans* ATCC 60138 e ATCC 90028.

Oito dos 16 isolados de *C. albicans* (50,0%) foram fortemente produtores de proteinase e nove isolados (56,25%) foram fortemente produtores de fosfolipase (Tabela 3). Quatro isolados (25%) foram fortemente produtores e ambas as exoenzimas.

Tabela 2. Atividade enzimática (Pz): produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase e morfotipos de cepas padrão de *Candida albicans*.

Cepas padrão de <i>C. albicans</i>	Proteinase* PZ	Índice	Fosfolipase PZ	Índice	Morfotipos**
ATCC 60138	1	1	0,39	3	5346
ATCC 90028	1	1	1	1	5346

* Atividade enzimática: Pz = 1,0 = Ausência de atividade enzimática - (Índice:1)
 0,64 ≤ Pz < 1,0 = Atividade enzimática positiva - (Índice: 2)
 Pz < 0,64 = Atividade fortemente positiva - (Índice: 3)

** Código dos morfotipos de *C. albicans* conforme modelo de Phongpaichi, 1987-
 modificado por Hunter *et al.*, 1989

Tabela 3. Atividade enzimática (Pz): produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase e morfotipos de isolados de *Candida albicans*.

Isolados de <i>C. albicans</i>	Proteinase PZ *	Índice	Fosfolipase PZ	Índice	Morfotipos**
14	1	1	1	1	7336
19	0,39	3	1	1	5346
660	0,40	3	1	1	5346
668	0,42	3	0,48	3	7336
686	1	1	0,54	3	5346
762	1	1	1	1	5346
874	1	1	1	1	5336
938	0,36	3	0,42	3	5305
947	1	1	0,39	3	5336
949	0,32	3	1	1	7336
954	0,36	3	1	1	5336
973	1	1	0,37	3	5346
982	1	1	0,45	3	5346
993	1	1	0,33	3	5336
1009	0,28	3	0,37	3	5336
1026	0,40	3	0,37	3	5331

*Atividade enzimática: Pz = 1,0 = Ausência de atividade enzimática - (Índice:1)
 0,64 ≤ Pz < 1,0 = Atividade enzimática positiva - (Índice: 2)
 Pz < 0,64 = Atividade fortemente positiva - (Índice: 3)

** Código dos morfotipos de *C. albicans* conforme modelo de Phongpaichi, 1987-
 modificado por Hunter *et al.*, 1989

As tabelas 2 e 3 apresentam os morfotipos das cepas padrão e dos isolados de *C. albicans*. Três isolados apresentaram franjas contínuas com filamentos em paralelo (código 7) e comprimento entre 3 e 5 mm (Tabela 3 e Figura 7).



Figura 7 Isolado 949 de *C. albicans* morfotipo 7336
Código conforme modelo de Pongpaichit, 1987- modificado por Hunter *et al*, 1989.

4.2 Atividade do óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* Hooker sobre *C. albicans*

A cepa ATCC 90024 e os isolados 660, 668, 686, 762, 947, 973, 982, 993, 1009 e 1026 (11/18) de *C. albicans* foram sensíveis ao óleo essencial de *E. citriodora* até a concentração de 87,89 µg/mL (0,09%). (Tabela 4).

Os valores de CFM₅₀ e CFM₉₀ para o óleo essencial de *E. citriodora*, nos diferentes isolados e cepas padrão foram 87,89 µg/mL (0,09%) e 175,78 µg/mL (0,19%) respectivamente (Tabela 6).

A pesquisa de tubo germinativo e clamidoconídeo após contato com o óleo essencial de *E. citriodora* (dose subinibitória) foi realizada apenas nos isolados sensíveis a concentrações acima que 87,89 µg/mL. Seis isolados e uma cepa padrão foram sensíveis a essa concentração (Tabela 4). O isolado número 19 foi o único que apresentou tubo germinativo e clamidoconídeo sob a influência deste óleo essencial (Tabela 4). Morfologicamente, ocorreram alterações quanto ao tamanho e forma das células nesses isolados, em relação ao controle. (Figuras 8 A e B).

A produção de proteinase e fosfolipase também foi realizada apenas nos isolados sensíveis a concentrações acima de 87,89 µg/mL. A produção de proteinase foi inibida em 4 (19, 938, 949 e 954) isolados produtores e a produção de fosfolipase foi inibida frente a este óleo essencial em todos os isolados sensíveis a concentrações acima de 87,89 µg/mL. Na cepa padrão ATCC 60193 a produção dessa enzima foi reduzida de PZ 0,39 para PZ 0,47 (Tabela 5).

A pesquisa da produção de franjas também foi realizada apenas nos isolados sensíveis a concentrações acima de 87,89 µg/mL. Nos isolados números 19 e 874, após contato com o óleo essencial de *E. citriodora* nas concentrações sub inibitórias, as franjas passaram de contínua, somente na periferia ou fios conspícuos em leques (5); para contínuas com filamentos paralelos (7). Quanto ao comprimento da franja, não ocorreu alteração. No isolado número 938 ocorreu alteração na colônia (Figuras 9 A e B)

Tabela 4. Concentração Fungicida Mínima, formação de tubo germinativo e clamidoconídeo, nos isolados biológicos e nas cepas padrão ATCC 60193 e ATCC 90028 de *C. albicans* expostos ao óleo essencial de *E. citriodora* Hooker na dose subinibitória.

<i>Eucalyptus citriodora</i>	CFM*		Tubo Germinativo	Tubo Germinativo	Clamidoconídeo	Clamidoconídeo
	µg/mL	% (v/v)**	Antes da atividade do óleo essencial	Após a atividade do óleo essencial	Antes da atividade do óleo essencial	Após a atividade do óleo essencial
Cepas Padrão/ Isolados						
ATCC60193	175,78	0,19	Presente	Ausente	Presente	Ausente
ATCC90028	87,89	0,09	Presente	NR***	Presente	NR
14	703,12	0,78	Presente	Ausente	Presente	Ausente
19	175,78	0,19	Presente	Presente	Presente	Presente
660	87,89	0,09	Presente	NR	Presente	NR
668	87,89	0,09	Presente	NR	Presente	NR
686	87,89	0,09	Presente	NR	Presente	NR
762	87,89	0,09	Presente	NR	Presente	NR
874	175,78	0,19	Presente	Ausente	Presente	Ausente
938	351,56	0,39	Presente	Ausente	Presente	Ausente
947	87,89	0,09	Presente	NR	Presente	NR
949	175,78	0,19	Presente	Ausente	Presente	Ausente
954	175,78	0,19	Presente	Ausente	Presente	Ausente
973	87,89	0,09	Presente	NR	Presente	NR
982	87,89	0,09	Presente	NR	Presente	NR
993	87,89	0,09	Presente	NR	Presente	NR
1009	87,89	0,09	Presente	NR	Presente	NR
1026	87,89	0,09	Presente	NR	Presente	NR

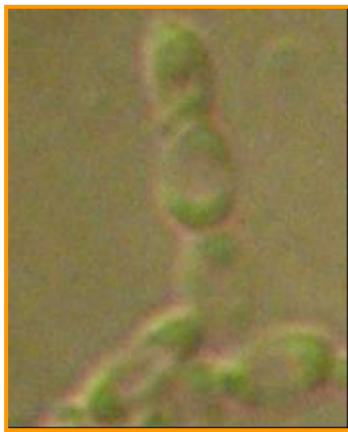
Condições do estudo: Pesquisa da concentração fungicida mínima CFM em placas de

microdiluição e após leitura em 24 horas: Pesquisa da atividade fungistática e fungicida em Ágar Sabouraud dextrose e leitura em 24 horas: presença de crescimento atividade fungistática e ausência de crescimento atividade fungicida (CFM), resultado em % e µg/mL

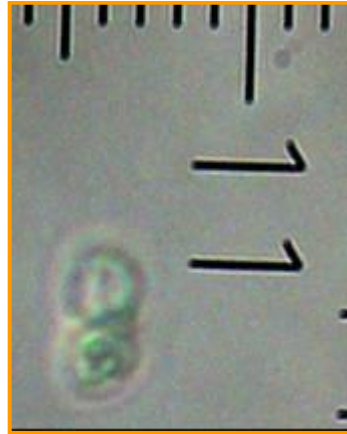
*CFM: concentração fungicida mínima

** v/v: volume por volume em porcentagem

***NR Não realizado nos isolados sensíveis a concentração de 87,89 µg/mL.



A



B

Figura 8 A e B. A - isolado 14 de *C. albicans* após exposição ao óleo essencial de *E. citriodora* (concentração subinibitória - 351,56 $\mu\text{g/mL}$) com alteração das características micromorfológicas - aumento 400X.

B - isolado 938 de *C. albicans* após exposição ao óleo essencial de *E. citriodora* (concentração subinibitória - 175,78 $\mu\text{g/mL}$) com alteração das características micromorfológicas - aumento 400X



A



B

Figura 9 A e B. A - isolado 938 - morfotipo 7305 antes do contato com óleo essencial de *E. citriodora*

B - Isolado 938 - morfotipo 7335 após contato com óleo essencial de *E. citriodora*.

Tabela 5. Atividade enzimática (produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase) e morfotipos dos isolados biológicos e das cepas padrão ATCC 60193 e ATCC 90028 de *C. albicans* expostos ao óleo essencial de *E. citriodora* Hooker na dose subinibitória.

<i>Eucalyptus citriodora</i>	CFM*		Proteinase**** PZ	Proteinase PZ	Fosfolipase PZ	Fosfolipase PZ	Morfotipos*****	Morfotipos
	µg/mL	% (v/v)**	Antes da atividade do do óleo essencial	Após a atividade do óleo essencial	Antes da atividade do do óleo essencial	Após a atividade do óleo essencial	Antes da atividade do do óleo essencial	Após a atividade do óleo essencial
ATCC60193	175,78	0,19	1	1	0,39	0,47	5346	5346
ATCC90028	87,89	0,09	1	NR***	1	NR	5346	NR
14	703,12	0,78	1	1	1	1	7336	7346
19	175,78	0,19	0,39	1	1	1	5346	7346
660	87,89	0,09	0,40	NR	1	NR	5346	NR
668	87,89	0,09	0,42	NR	0,48	NR	7336	NR
686	87,89	0,09	1	NR	0,54	NR	5346	NR
762	87,89	0,09	1	NR	1	NR	5346	NR
874	175,78	0,19	1	1	1	1	5336	7335
938	351,56	0,39	0,36	1	0,42	1	7305	7335
947	87,89	0,09	1	NR	0,39	NR	5336	NR
949	175,78	0,19	0,32	1	1	1	7336	7336
954	175,78	0,19	0,36	1	1	1	7336	7346
973	87,89	0,09	1	NR	0,37	NR	5346	NR
982	87,89	0,09	1	NR	0,45	NR	5346	NR
993	87,89	0,09	1	NR	0,33	NR	5336	NR
1009	87,89	0,09	0,28	NR	0,37	NR	5336	NR
1026	87,89	0,09	0,40	NR	0,37	NR	5331	NR

Condições do estudo: Pesquisa da concentração fungicida mínima CFM em placas

microdiluição e após leitura em 24 horas: Pesquisa da atividade fungistática e fungicida em Ágar Sabouraud dextrose e leitura em 24 horas: presença de crescimento atividade fungistática e ausência de crescimento atividade fungicida (CFM), resultado em % e µg/mL

*CFM: concentração fungicida mínima

** v/v: volume por volume em porcentagem

*** NR Não realizado nos isolados sensíveis a concentração de 87,89 µg/mL

****Atividade enzimática Pz = 1,0 = Ausência de atividade enzimática - índice 1

0,64 ≤ Pz < 1,0 = Atividade enzimática positiva – índice 2

Pz < 0,64 = Atividade fortemente positiva – índice 3

*****Código dos morfotipos de *C. albicans* conforme modelo de Pongpaichit, 1987 - modificado por Hunter *et al.*, 1989

Tabela 6. Valores de Concentração Fungicida Mínima CFM 50 e CFM 90 do óleo essencial de *E. citriodora* Hooker sobre cepas padrão ATCC 60193 e ATCC 90028 e isolados de *C. albicans*

Óleo essencial de <i>Eucalyptus citriodora</i>	Concentração Fungicida Mínima (CFM)	
	CFM 50* µg/mL - % (v/v)	CFM 90** µg/ml - % (v/v)
<i>Candida albicans</i>	87,89 – 0,09	175,78 – 0,19

Condições do estudo: Pesquisa da Concentração fungicida mínima (CFM) em placas de ágar Sabouraud dextrose e leitura em 24 horas: resultado em µg/mL e v/v

CFM: concentração fungicida mínima

*CFM 50 CFM de um antifúngico capaz de inibir o crescimento de 50% dos Isolados.

**CFM 90 CFM de um antifúngico capaz de inibir o crescimento de 90% dos Isolados

v/v: volume por volume em porcentagem

4.3 Atividade do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* Labill sobre *C. albicans*

Os isolados 762, 954, 982 (03/18) (16,67%) de *C. albicans* foram sensíveis ao óleo essencial de *E. globulus* até a concentração de 87,89 µg/mL (0,09%). (Tabela 7).

Os valores de CFM 50 e CFM 90 para o óleo essencial de *E. globulos* nos diferentes isolados e cepas padrão foram 703,12 µg/mL (0,78%) e 5625 µg/mL (6,25%) respectivamente (Tabela 9).

A pesquisa de tubo germinativo e clamidoconídeo após contato com o óleo essencial de *E. globulus* (dose subinibitória) foi realizada apenas nos isolados sensíveis a concentrações acima de 87,89µg/mL. Os isolados 14, 686, 938, 949, 1009 apresentaram tubo germinativo e clamidoconídeo sob a influência desse óleo essencial (Tabela 7). Morfologicamente, ocorreram alterações quanto ao tamanho e forma das células nesses isolados em relação ao controle. (Figuras 10 A e B).

A produção de proteinase e fosfolipase também foi realizada apenas nos isolados sensíveis a concentrações acima de 87,59 µg/mL A produção de proteinase foi inibida em sete (19, 660, 686, 938, 949, 1009 e 1026) isolados produtores e três isolados não produtores passaram a produzir esta enzima (14, 947 e 993). A produção de fosfolipase foi inibida frente a este óleo essencial em seis isolados produtores (668, 686, 938, 973, 1009 e 1026); uma cepa padrão ATCC 60193 e um isolado não produtor (14) passou a produzir esta enzima (Tabela 8).

A pesquisa da produção de franjas também foi realizada apenas nos isolados sensíveis a concentrações acima de 87,89µg/mL. Nos isolados 668 e 949 após contato com o óleo essencial de *E. glóbulos*, nas concentrações sub inibitórias, as franjas passaram de contínuas com filamentos paralelos (7) para contínua, somente na periferia ou fios conspícuos em leques (5). Quanto ao comprimento da franja, não ocorreu alteração. No isolado número 938 ocorreu alteração da colônia (Figuras 11 A e B).

Tabela 7. Concentração Fungicida Mínima, formação de tubo germinativo e clamidoconídeo, nos isolados biológicos e nas cepas padrão ATCC 60193 e ATCC 90028 de *C. albicans* expostos ao óleo essencial de *E. globulos* Labill na dose subinibitória.

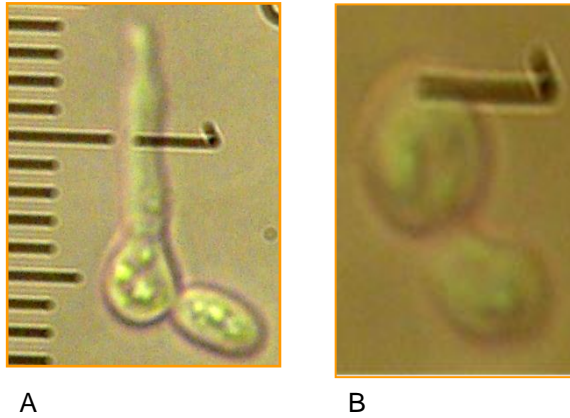
<i>Eucalyptus globulos</i>	CFM*		Tubo Germinativo	Tubo Germinativo	Clamidoconídeo	Clamidoconídeo
	µg/mL	% (v/v)**	Antes da atividade do óleo essencial	Após a atividade do óleo essencial	Antes da atividade do óleo essencial	Após a atividade do óleo essencial
ATCC60193	175,78	0,19	Presente	Ausente	Presente	Ausente
ATCC90028	175,78	0,19	Presente	Ausente	Presente	Ausente
14	5625,00	6,25	Presente	Presente	Presente	Presente
19	2812,50	3,12	Presente	Ausente	Presente	Ausente
660	175,78	0,19	Presente	Ausente	Presente	Presente
668	22500,00	25	Presente	Ausente	Presente	Ausente
686	175,78	0,19	Presente	Presente	Presente	Presente
762	87,89	0,09	Presente	NR***	Presente	NR
874	351,56	0,39	Presente	Ausente	Presente	Presente
938	5625,00	6,25	Presente	Presente	Presente	Presente
947	703,12	0,78	Presente	Ausente	Presente	Ausente
949	5625,00	6,25	Presente	Presente	Presente	Presente
954	87,89	0,09	Presente	NR	Presente	NR
973	703,12	0,78	Presente	Ausente	Presente	Ausente
982	87,89	0,09	Presente	NR	Presente	NR
993	1406,25	1,56	Presente	Ausente	Presente	Ausente
1009	1406,25	1,56	Presente	Presente	Presente	Presente
1026	2812,50	3,12	Presente	Ausente	Presente	Presente

Condições do estudo: Pesquisa da concentração fungicida mínima CFM em placas de microdiluição e após leitura em 24 horas: Pesquisa da atividade fungistática e fungicida em Ágar Sabouraud dextrose e leitura em 24 horas: presença de crescimento atividade fungistática e ausência de crescimento atividade fungicida (CFM), resultado em % e µg/mL

*CFM: concentração fungicida mínima

** v/v: volume por volume em porcentagem

*** NR Não realizado nos isolados sensíveis a concentração de 87,89 µg/mL



A

B

Figuras 10 A e B. A - isolado 14 de *C. albicans* após exposição ao óleo essencial de *E. globulos* (concentração subinibitória - 2812,50µg/mL) com alteração das características micromorfológicas - aumento 400X.

B isolado 874 de *C. albicans* após exposição ao óleo essencial de *E. globulos* (concentração subinibitória - 175,78 µg/mL) com alteração das características micromorfológicas da célula - aumento 400X



A

B

Figura 11 A e B. A - Isolado 938 - morfotipo 5305 antes do contato com óleo essencial de *E. globulus*.

B - Isolado 938 - morfotipo 5344 após contato com óleo essencial de *E. globulus*.

Tabela 8. Atividade enzimática (produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase) e morfotipos dos isolados biológicos e das cepas padrão ATCC 60193 e ATCC 90028 de *C. albicans* expostos ao óleo essencial de *E. globulos* Labill na dose subinibitória.

<i>Eucalyptus globulos</i>	CFM*		Proteinase**** PZ	Proteinase PZ	Fosfolipase PZ	Fosfolipase PZ	Morfotipos****	Morfotipos
	µg/mL	% (v/v)**	Antes da atividade do óleo essencial	Após a atividade do óleo essencial	Antes da atividade do óleo essencial	Após a atividade do óleo essencial	Antes da atividade do óleo essencial	Após a atividade do óleo essencial
ATCC60193	175,78	0,19	1	1	0,39	1	5346	5346
ATCC90028	175,78	0,19	1	1	1	1	5346	5346
14	5625,00	6,25	1	0,46	1	0,41	7336	7336
19	2812,50	3,12	0,39	1	1	1	5346	5346
660	175,78	0,19	0,40	1	1	1	5346	5346
668	22500,00	25	0,42	1	0,48	1	7336	5346
686	175,78	0,19	1	1	0,54	1	5346	5346
762	87,89	0,09	1	NR***	1	NR	5346	NR
874	351,56	0,35	1	1	1	1	5336	5344
938	5625,00	6,25	0,36	1	0,42	1	5305	5344
947	703,12	0,78	1	0,35	0,39	0,41	5336	5346
949	5625,00	6,25	0,32	1	1	1	7336	5346
954	87,89	0,09	0,36	NR	1	NR	7336	NR
973	703,12	0,78	1	1	0,37	1	5346	5346
982	87,89	0,09	1	NR	0,45	NR	5346	NR
993	1406,25	1,56	1	0,43	0,33	0,33	5336	5346
1009	1406,25	1,56	0,28	1	0,37	1	5336	5346
1026	2812,50	3,12	0,40	1	0,37	1	5331	5346

Condições do estudo: Pesquisa da concentração fungicida mínima CFM em placas

microdiluição e após leitura em 24 horas: Pesquisa da atividade fungistática e fungicida em Ágar Sabouraud dextrose e leitura em 24 horas: presença de crescimento atividade fungistática e ausência de crescimento atividade fungicida (CFM), resultado em % e µg/mL

*CFM: concentração fungicida mínima

** v/v: volume por volume em porcentagem

*** NR Não realizado nos isolados sensíveis a concentração de 87,89 µg/mL

****Atividade enzimática Pz=1,0 = Ausência de atividade enzimática - índice 1

0,64 ≤ Pz < 1,0= Atividade enzimática positiva – índice 2

Pz < 0,64 = Atividade fortemente positiva – índice 3

*****Código dos morfotipos de *C. albicans* conforme modelo de Pongpaichit, 1987- modificado por Hunter *et al.*, 1989

Tabela 9. Valores de CFM 50 e CFM 90 do óleo essencial de *E. globulos* Labill sobre cepas padrão ATCC 60193 e ATCC 90028 e isolados de *C. albicans*.

Óleo essencial de <i>Eucalyptus globulos</i>	Concentração Fungicida Mínima (CFM)	
	CFM 50* µg/mL - % (v/v)	CFM 90** µg/ml - % (v/v)
<i>Candida albicans</i>	703,12– 0,78	5625 – 6,25

Condições do estudo: Pesquisa da Concentração fungicida mínima (CFM) em placas de ágar Sabouraud dextrose e leitura em 24 horas: resultado em µg/mL

CFM: concentração fungicida mínima

*CFM 50 CFM de um antifúngico capaz de inibir o crescimento de 50% dos Isolados.

**CFM 90 CFM de um antifúngico capaz de inibir o crescimento de 90% dos Isolados
v/v: volume por volume em porcentagem

4.4 Atividade do óleo essencial de *Eugenia caryophyllus* Sprengel sobre *C. albicans*

Os isolados 660, 993 e 1026 e as cepas padrão ATCC 60193 e ATCC 90024 de *C. albicans* foram sensíveis ao óleo essencial de *Eugenia caryophyllus* até a concentração de 87,89 µg/mL (0,09%). (Tabela 10).

Os valores de CFM 50 e CFM 90 para o óleo essencial de *Eugenia caryophyllus*, nos diferentes isolados e cepas padrão foram de 175,8 µg/mL (0,19%) e 703,1 µg/mL (0,78%), respectivamente (Tabela 12).

A pesquisa de tubo germinativo e clamidoconídeo, após contato com o óleo essencial de *Eugenia caryophyllus* (dose subinibitória) foi realizada apenas nos isolados sensíveis a concentrações acima de 87,89µg/mL. Cinco isolados foram sensíveis a essa concentração. Os isolados 14, 762, 874, 938, 947,949 e 982 apresentaram tubo germinativo e clamidoconídeo sob a influência desse óleo essencial (Tabela 10).

A pesquisa da produção de proteinase e fosfolipase também foi realizada apenas nos isolados sensíveis a concentrações acima de 87,89µg/mL. A produção de proteinase foi inibida em todos os isolados produtores e um isolado não produtor passou a produzir esta enzima (11). A produção de fosfolipase foi inibida frente a este óleo essencial em todos os isolados; dois isolados não produtores (14 e 954) passaram a produzir esta enzima (Tabela 11).

A pesquisa da produção de franjas também foi realizada apenas nos isolados sensíveis a concentrações acima de 87,89µg/mL. Nos isolados 668, 949 e 954, após contato com o óleo essencial de *Eugenia caryophyllus* nas concentrações sub inibitórias, as franjas passaram de contínuas com filamentos paralelos (7) para contínua, somente na periferia ou fios conspícuos em leques (5). Não ocorreu alteração no comprimento da franja. No isolado número 762 ocorreu alteração da colônia (Figuras 12 A e B).

Tabela 10. Concentração Fungicida Mínima, formação de tubo germinativo e clamidoconídeo dos isolados biológicos e das cepas padrão ATCC 60193 e ATCC 90028 de *C. albicans* expostos ao óleo essencial de *Eugenia caryophyllus* Sprengel na dose subinibitória.

<i>Eugenia caryophyllus</i>	CFM*		Tubo Germinativo	Tubo Germinativo	Clamidoconídeo	Clamidoconídeo
	µg/mL	% (v/v)**	Antes da atividade do óleo essencial	Após a atividade do óleo essencial	Antes da atividade do óleo essencial	Após a atividade do óleo essencial
ATCC60193	87,89	0,09	Presente	NR***	Presente	NR
ATCC90028	87,89	0,09	Presente	NR	Presente	NR
14	175,78	0,19	Presente	Presente	Presente	Presente
19	175,78	3,12	Presente	Ausente	Presente	Ausente
660	87,89	0,09	Presente	NR	Presente	NR
668	2812,50	3,12	Presente	Ausente	Presente	Presente
686	351,56	0,39	Presente	Ausente	Presente	Presente
762	351,56	0,39	Presente	Presente	Presente	Presente
874	351,56	0,39	Presente	Presente	Presente	Presente
938	1406,25	1,56	Presente	Presente	Presente	Presente
947	703,12	0,78	Presente	Presente	Presente	Presente
949	703,12	0,78	Presente	Presente	Presente	Presente
954	175,78	0,19	Presente	Ausente	Presente	Ausente
973	175,78	0,19	Presente	Ausente	Presente	Ausente
982	351,56	0,39	Presente	Presente	Presente	Presente
993	87,89	0,09	Presente	NR	Presente	NR
1009	175,78	0,19	Presente	Ausente	Presente	Presente
1026	87,89	0,09	Presente	NR	Presente	NR

Condições do estudo: Pesquisa da concentração fungicida mínima CFM em placas de microdiluição e após leitura em 24 horas: Pesquisa da atividade fungistática e fungicida em Ágar Sabouraud dextrose e leitura em 24 horas: presença de crescimento atividade fungistática e ausência de crescimento atividade fungicida (CFM), resultado em % e µg/mL

*CFM: concentração fungicida mínima

** v/v: volume por volume em porcentagem

*** NR Não realizado nos isolados sensíveis a concentração de 87,89 µg/mL

Tabela 11. Atividade enzimática (produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase) e morfotipos dos isolados biológicos e das cepas padrão ATCC 60193 e ATCC 90028 de *C. albicans* expostos ao óleo essencial de *Eugenia caryophyllus* Sprengel na dose subinibitória.

<i>Eugenia caryophyllus</i>	CFM*		Proteinase**** PZ	Proteinase PZ	Fosfolipase PZ	Fosfolipase PZ	Morfotipos*****	Morfotipos
Cepas Padrão/ Isolados	µg/mL	% (v/v)**	Antes da atividade do do óleo essencial	Após a atividade do óleo essencial	Antes da atividade do do óleo essencial	Após a atividade do óleo essencial	Antes da atividade do do óleo essencial	Após a atividade do óleo essencial
ATCC60193	87,89	0,09	1	NR***	0,39	NR	5346	NR
ATCC90028	87,89	0,09	1	NR	1	NR	5346	NR
14	175,78	0,19	1	0,43	1	0,43	7336	7336
19	175,78	3,12	0,39	1	1	1	5346	5346
660	87,89	0,09	0,40	NR	1	NR	5346	NR
668	2812,50	3,12	0,42	1	0,48	1	7336	5346
686	351,56	0,39	1	1	0,54	1	5346	5346
762	351,56	0,39	1	1	1	1	5346	5335
874	351,56	0,39	1	1	1	1	5336	5346
938	1406,25	1,56	0,36	1	0,42	1	5305	5335
947	703,12	0,78	1	1	0,39	1	5336	5346
949	703,12	0,78	0,32	1	1	1	7336	5346
954	175,78	0,19	0,36	1	1	0,48	7336	5346
973	175,78	0,19	1	1	0,37	1	5346	5346
982	351,56	0,39	1	1	0,45	1	5346	5346
993	87,89	0,09	1	NR	0,33	NR	5336	NR
1009	175,78	0,19	0,28	1	0,37	1	5336	5336
1026	87,89	0,09	0,40	NR	0,37	NR	5331	NR

Condições do estudo: Pesquisa da concentração fungicida mínima CFM em placas

microdiluição e após leitura em 24 horas: Pesquisa da atividade fungistática e fungicida em Ágar Sabouraud dextrose e leitura em 24 horas: presença de crescimento atividade fungistática e ausência de crescimento atividade fungicida (CFM), resultado em % e µg/mL

*CFM: concentração fungicida mínima

** v/v: volume por volume em porcentagem

*** NR Não realizado nos isolados sensíveis a concentração de 87,89 µg/mL

****Atividade enzimática Pz =1,0 = Ausência de atividade enzimática - índice 1

0,64 ≤ Pz < 1,0= Atividade enzimática positiva – índice 2

Pz < 0,64 = Atividade fortemente positiva – índice 3

*****Código dos morfotipos de *C. albicans* conforme modelo de Pongpaichit, 1987- modificado por Hunter *et al.*, 1989

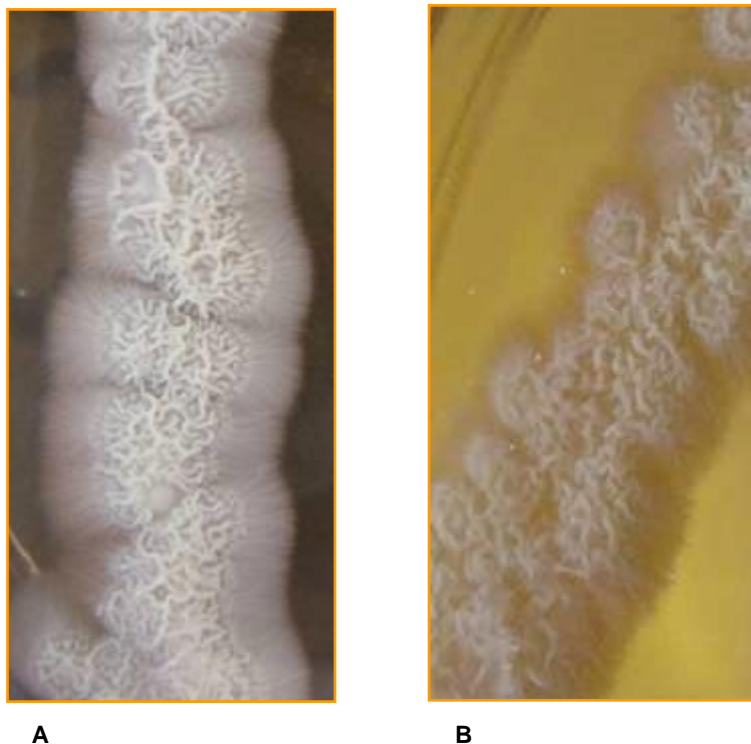


Figura 12 A e B. **A** - Isolado 762 - morfotipo 5346 antes do contato com óleo essencial de *Eugenia caryophyllus*.
B - Isolado 762 - morfotipo 5335 após contato com óleo essencial de *Eugenia caryophyllus*

Tabela 12. Valores de CFM 50 e CFM 90 do óleo essencial de *Eugenia caryophyllus* Sprengel sobre cepas padrão ATCC 60193 e ATCC 90028 e isolados de *C. albicans*

Óleo essencial de <i>Eugenia caryophyllus</i>	Concentração Fungicida Mínima (CFM)	
	CFM 50* µg/mL - % (v/v)	CFM 90** µg/ml - % (v/v)
<i>Candida albicans</i>	175,8 – 0,19	703,1 – 0,78

Condições do estudo: Pesquisa da Concentração fungicida mínima (CFM) em placas de ágar Sabouraud dextrose e leitura em 24 horas: resultado em µg/mL

CFM: concentração fungicida mínima

*CFM 50 CFM de um antifúngico capaz de inibir o crescimento de 50% dos Isolados.

**CFM 90 CFM de um antifúngico capaz de inibir o crescimento de 90% dos Isolados

v/v: volume por volume em porcentagem

4.5 Atividade do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel sobre *C. albicans*

Os isolados e as cepas padrão ATCC 60193 e ATCC 90024 de *C. albicans* foram sensíveis ao óleo essencial de *Melaleuca aternifolia* até a concentração de 703,12 µg/mL (0,78%). (Tabela 13).

Os valores de CFM 50 e CFM 90 para o óleo essencial de *Melaleuca aternifolia*, nos diferentes isolados e cepas padrão foram 1406,50 µg/mL (1,56%) e 2812,50 µg/mL (3,12%), respectivamente (Tabela 15).

A formação de tubo germinativo e clamidoconídeo nos isolados e cepas padrão foram mantidas após contato com o óleo essencial de *Melaleuca aternifolia* na dose subinibitória. A inibição da formação do tubo germinativo ocorreu apenas nos isolados 660 e 1026. (Tabela 13).

A produção de proteinase foi inibida nos isolados 938, 949,1009 e 1026. Os isolados 686, 762, 874, 947, 973 e 982 não produtores passaram a produzir esta enzima. A produção de fosfolipase foi inibida frente a este óleo essencial nos isolados 938, 973, 1009 e na cepa padrão 60193. Sete isolados não produtores (14,19,660, 762, 874, 949 e 954) passaram a produzir esta enzima (Tabela 14).

A produção de franjas nos isolados números 668, 949 e 954, após contato com o óleo essencial de *Melaleuca aternifolia* nas concentrações sub inibitórias passaram de contínuas com filamentos paralelos (7) para contínua, somente na periferia ou fios conspícuos em leques (5). E nos isolados 762 e 947 as franjas passaram de contínua, somente na periferia ou fios conspícuos em leques (5) para contínuas com filamentos paralelos (7) Não ocorreu alteração no comprimento da franja. No isolado número 762 ocorreu alteração na colônia (Figuras 13 A e B).

Tabela 13. Concentração Fungicida Mínima, formação de tubo germinativo e clamidoconídeo nos isolados biológicos e nas cepas padrão ATCC 60193 e ATCC 90028 de *C. albicans* expostos ao óleo essencial de *Melaleuca aternifolia* Cheel na dose subinibitória.

<i>Melaleuca aternifolia</i>	CFM*		Tubo Germinativo	Tubo Germinativo	Clamidoconídeo	Clamidoconídeo
	µg/mL	% (v/v)**	Antes da atividade do óleo essencial	Após a atividade do óleo essencial	Antes da atividade do óleo essencial	Após a atividade do óleo essencial
ATCC60193	1406,25	1,56	Presente	Ausente	Presente	Presente
ATCC90028	703,12	0,78	Presente	Presente	Presente	Presente
14	1406,25	1,56	Presente	Presente	Presente	Presente
19	703,12	0,78	Presente	Presente	Presente	Presente
660	1406,25	1,56	Presente	Ausente	Presente	Presente
668	1406,25	1,56	Presente	Presente	Presente	Presente
686	1406,25	1,56	Presente	Presente	Presente	Presente
762	2812,50	3,12	Presente	Presente	Presente	Presente
874	2812,50	3,12	Presente	Presente	Presente	Presente
938	1406,25	1,56	Presente	Presente	Presente	Presente
947	703,12	0,78	Presente	Presente	Presente	Presente
949	1406,25	1,56	Presente	Presente	Presente	Presente
954	703,12	0,78	Presente	Presente	Presente	Presente
973	1406,25	1,56	Presente	Presente	Presente	Presente
982	1406,25	1,56	Presente	Presente	Presente	Presente
993	1406,25	1,56	Presente	Presente	Presente	Presente
1009	2812,50	3,12	Presente	Presente	Presente	Presente
1026	2812,50	3,12	Presente	Ausente	Presente	Presente

Condições do estudo: Pesquisa da concentração fungicida mínima CFM em placas de microdiluição e após leitura em 24 horas: Pesquisa da atividade fungistática e fungicida em Ágar Sabouraud dextrose e leitura em 24 horas: presença de crescimento atividade fungistática e ausência de crescimento atividade fungicida (CFM), resultado em % e µg/mL

*CFM: concentração fungicida mínima

** v/v: volume por volume em porcentagem

Tabela 14. Atividade enzimática (produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase) e morfotipos dos isolados biológicos e das cepas padrão ATCC 60193 e ATCC 90028 de *C. albicans* expostos ao óleo essencial de *Melaleuca aternifolia* Cheel na dose subinibitória.

<i>Melaleuca aternifolia</i>	CFM*		Proteinase*** PZ	Proteinase PZ	Fosfolipase PZ	Fosfolipase PZ	Morfotipos*****	Morfotipos
	µg/mL	% (v/v)**	Antes da atividade do do óleo essencial	Após a atividade do óleo essencial	Antes da atividade do do óleo essencial	Após a atividade do óleo essencial	Antes da atividade do do óleo essencial	Após a atividade do óleo essencial
ATCC60193	1406,25	1,56	1	1	0,39	1	5346	5346
ATCC90028	703,12	0,78	1	1	1	1	5346	5346
14	1406,25	1,56	1	1	1	0,47	7336	7336
19	703,12	0,78	0,39	0,33	1	0,39	5346	5346
660	1406,25	1,56	0,40	0,42	1	0,42	5346	5346
668	1406,25	1,56	0,42	0,38	0,48	0,46	7336	5346
686	1406,25	1,56	1	0,41	0,54	0,42	5346	5346
762	2812,50	3,12	1	0,4	1	0,47	5346	7335
874	2812,50	3,12	1	0,43	1	0,47	5336	5346
938	1406,25	1,56	0,36	1	0,42	1	5305	5335
947	703,12	0,78	1	0,45	0,39	0,43	5336	7335
949	1406,25	1,56	0,32	1	1	0,48	7336	5346
954	703,12	0,78	0,36	0,46	1	0,44	7336	5346
973	1406,25	1,56	1	0,47	0,37	1	5346	5346
982	1406,25	1,56	1	0,42	0,45	0,42	5346	5346
993	1406,25	1,56	1	1	0,33	0,47	5336	5346
1009	2812,50	3,12	0,28	1	0,37	1	5336	5346
1026	2812,50	3,12	0,40	1	0,37	0,48	5331	5346

Condições do estudo: Pesquisa da concentração fungicida mínima CFM em placas

microdiluição e após leitura em 24 horas: Pesquisa da atividade fungistática e fungicida em Ágar Sabouraud dextrose e leitura em 24 horas: presença de crescimento atividade fungistática e ausência de crescimento atividade fungicida (CFM), resultado em % e µg/mL

*CFM: concentração fungicida mínima

** v/v: volume por volume em porcentagem

***Atividade enzimática Pz =1,0 = Ausência de atividade enzimática - índice 1

0,64 ≤ Pz < 1,0 = Atividade enzimática positiva – índice 2

Pz < 0,64 = Atividade fortemente positiva – índice 3

*****Código dos morfotipos de *C. albicans* conforme modelo de Pongpaichit, 1987- modificado por Hunter *et al.*, 1989



A

B

Figura 13 A e B. A: isolado 762. Morfotipo 5346 antes do contato com óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel.

B: isolado 762. Morfotipo 7335 após contato com óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel.

Tabela 15. Valores de CFM 50 e CFM 90 do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel sobre cepas padrão ATCC 60193 e ATCC 90028 e isolados de *C. albicans*

Óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i>	Concentração Fungicida Mínima (CFM)	
	CFM 50* µg/mL - % (v/v)***	CFM 90** µg/ml - % (v/v)
<i>Candida albicans</i>	1406,50 – 1,56	2812,50 – 3,12

Condições do estudo: Pesquisa da Concentração fungicida mínima (CFM) em placas de ágar Sabouraud dextrose e leitura em 24 horas: resultado em µg/mL

CFM: concentração fungicida mínima

*CFM 50 CFM de um antifúngico capaz de inibir o crescimento de 50% dos Isolados.

**CFM 90 CFM de um antifúngico capaz de inibir o crescimento de 90% dos Isolados

*** v/v: volume por volume em porcentagem

4.6 Atividade do óleo essencial de *Thymus vulgaris* Lin sobre *C. albicans*

Os isolados 14, 660, 686, 762, 947, 954, 982, 993 e a cepa padrão ATCC 60193 de *C. albicans* foram sensíveis ao óleo essencial de *Thymus vulgaris* até a concentração de 87,89 µg/mL (0,09%). (Tabela 16).

Os valores de CFM 50 e CFM 90 para o óleo essencial de *Thymus vulgaris* nos diferentes isolados e cepas padrão, foram 87,89 µg/mL (0,09%) e 351,56 µg/mL (0,39%), respectivamente (Tabela 18).

A pesquisa de tubo germinativo e clamidoconídeo após contato com o óleo essencial de *Thymus vulgaris* (dose subinibitória) foram realizadas apenas nos isolados sensíveis a concentrações acima de 87,89 µg/mL. Nove isolados foram sensíveis a esta concentração. O isolado 938 e a cepa padrão ATCC 90028 apresentaram tubo germinativo e clamidoconídeo sob a influência desse óleo essencial (Tabela 16).

A pesquisa de produção de proteinase e fosfolipase também foi realizada apenas nos isolados sensíveis a concentrações acima de 87,89 µg/mL. A produção de proteinase foi inibida apenas na amostra 1009 e o isolado não produtor 874 passou a produzir esta enzima. A produção de fosfolipase foi inibida frente a este óleo essencial apenas no isolado 1009 e dois isolados não produtores (19 e 874) passaram a produzir esta enzima. (Tabela 17).

A pesquisa de produção de franjas também foi realizada apenas nos isolados sensíveis a concentrações acima de 87,89 µg/mL. Nos isolados númeroa 668 e 949, após contato com o óleo essencial de *Thymus vulgaris* nas concentrações sub inibitórias, as franjas passaram de contínuas com filamentos paralelos (7) para contínua, somente na periferia ou fios conspícuos em leques (5). Não ocorreu alteração no comprimento da franja. No isolado número 668, ocorreu alteração na colônia (Figuras 14 A e B).

Tabela 16. Concentração Fungicida Mínima, formação de tubo germinativo e clamidoconídeo, nos isolados biológicos e nas cepas padrão ATCC 60193 e ATCC 90028 de *C. albicans* expostos ao óleo essencial de *Thymus vulgaris* Lin na dose subinibitória.

<i>Thymus vulgaris</i>	CFM*		Tubo Germinativo	Tubo Germinativo	Clamidoconídeo	Clamidoconídeo
	µg/mL	% (v/v)**	Antes da atividade do óleo essencial	Após a atividade do óleo essencial	Antes da atividade do óleo essencial	Após a atividade do óleo essencial
ATCC60193	87,89	0,09	Presente	NR	Presente	NR
ATCC90028	351,56	0,39	Presente	Presente	Presente	Presente
14	87,89	0,09	Presente	NR	Presente	NR
19	175,78	0,19	Presente	Ausente	Presente	Ausente
660	87,89	0,09	Presente	NR	Presente	NR
668	351,56	0,39	Presente	Ausente	Presente	Presente
686	87,89	0,09	Presente	NR	Presente	NR
762	87,89	0,09	Presente	NR	Presente	NR
874	703,12	0,78	Presente	Ausente	Presente	Presente
938	351,56	0,39	Presente	Presente	Presente	Presente
947	87,89	0,09	Presente	NR	Presente	NR
949	175,78	0,78	Presente	Ausente	Presente	Presente
954	87,89	0,09	Presente	NR	Presente	NR
973	175,78	0,19	Presente	Ausente	Presente	Ausente
982	87,89	0,09	Presente	NR	Presente	NR
993	87,89	0,09	Presente	NR	Presente	NR
1009	175,78	0,19	Presente	Presente	Presente	Ausente
1026	175,78	0,09	Presente	Ausente	Presente	Ausente

Condições do estudo: Pesquisa da concentração fungicida mínima CFM em placas de microdiluição e após leitura em 24 horas: Pesquisa da atividade fungistática e fungicida em Ágar Sabouraud dextrose e leitura em 24 horas: presença de crescimento atividade fungistática e ausência de crescimento atividade fungicida (CFM), resultado em % e µg/mL

*CFM: concentração fungicida mínima

** v/v: volume por volume em porcentagem

***NR Não realizado nos isolados sensíveis a concentração de 87,89 µg/mL

Tabela 17. Atividade enzimática (produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase) e morfotipos dos isolados biológicos e das cepas padrão ATCC 60193 e ATCC 90028 de *C. albicans* expostos ao óleo essencial de *Thymus vulgaris* Lin na dose subinibitória.

<i>Thymus vulgaris</i>	CFM*		Proteinase**** PZ	Proteinase PZ	Fosfolipase PZ	Fosfolipase PZ	Morfotipos*****	Morfotipos
Cepas Padrão/ Isolados	µg/mL	% (v/v)**	Antes da atividade do do óleo essencial	Após a atividade do óleo essencial	Antes da atividade do do óleo essencial	Após a atividade do óleo essencial	Antes da atividade do do óleo essencial	Após a atividade do óleo essencial
ATCC60193	87,89	0,09	1	NR***	0,39	NR	5346	NR
ATCC90028	351,56	0,39	1	1	1	1	5346	5346
14	87,89	0,09	1	NR	1	NR	7336	NR
19	175,78	0,19	0,39	0,45	1	0,46	5346	5346
660	87,89	0,09	0,40	NR	1	NR	5346	NR
668	351,56	0,39	0,42	0,47	0,48	0,41	7336	5346
686	87,89	0,09	1	NR	0,54	NR	5346	NR
762	87,89	0,09	1	NR	1	NR	5346	NR
874	703,12	0,78	1	0,40	1	0,42	5336	5346
938	351,56	0,39	0,36	0,38	0,42	0,42	5305	5346
947	87,89	0,09	1	NR	0,39	NR	5336	NR
949	175,78	0,78	0,32	0,39	1	1	7336	5346
954	87,89	0,09	0,36	NR	1	NR	7336	NR
973	175,78	0,19	1	1	0,37	0,38	5346	5346
982	87,89	0,09	1	NR	0,45	NR	5346	NR
993	87,89	0,09	1	NR	0,33	NR	5336	NR
1009	175,78	0,19	0,28	1	0,37	1	5336	5346
1026	175,78	0,09	0,40	0,47	0,37	0,42	5331	5346

Condições do estudo: Pesquisa da concentração fungicida mínima CFM em placas

microdiluição e após leitura em 24 horas: Pesquisa da atividade fungistática e fungicida em Ágar Sabouraud dextrose e leitura em 24 horas: presença de crescimento atividade fungistática e ausência de crescimento atividade fungicida (CFM), resultado em % e µg/mL

*CFM: concentração fungicida mínima

** v/v: volume por volume em porcentagem

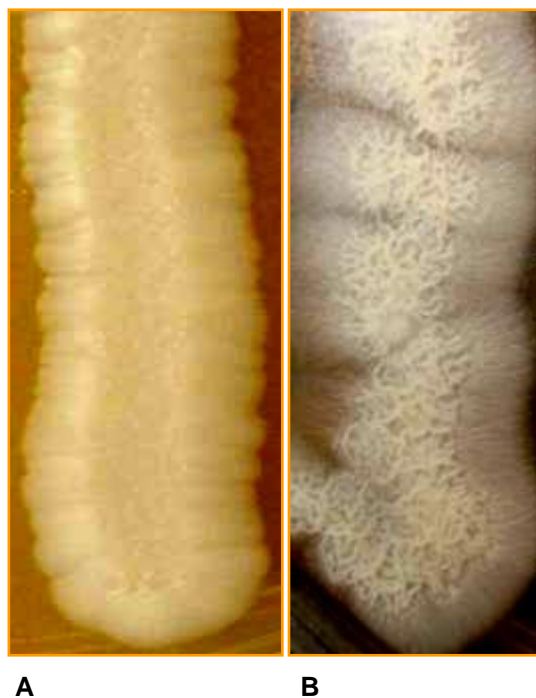
*** NR Não realizado nos isolados sensíveis a concentração de 87,89 µg/mL

****Atividade enzimática Pz =1,0 = Ausência de atividade enzimática - índice 1

0,64 ≤ Pz < 1,0= Atividade enzimática positiva – índice 2

Pz < 0,64 = Atividade fortemente positiva – índice 3

*****Código dos morfotipos de *C. albicans* conforme modelo de Pongpaichit, 1987- modificado por Hunter *et al.*, 1989



Figuras 14 A e B. **A** - Isolado 668. Morfotipo 7336 antes do contato com óleo essencial de *Thymus vulgaris* Lin
B - Isolado 668. Morfotipo 5346 após contato com óleo essencial de *Thymus vulgaris* Lin

Tabela 18. Valores de CFM 50 e CFM 90 do óleo essencial de *Thymus vulgaris* Lin sobre cepas padrão ATCC 60193 e ATCC 90028 e isolados de *C. albicans*

Óleo essencial de <i>Thymus vulgaris</i>	Concentração Fungicida Mínima (CFM)	
	CFM 50* µg/mL - % (v/v)***	CFM 90** µg/ml - % (v/v)
<i>Candida albicans</i>	87,89 – 0,09	351,56 – 0,39

Condições do estudo: Pesquisa da Concentração fungicida mínima (CFM) em placas de ágar Sabouraud dextrose e leitura em 24 horas: resultado em µg/mL

CFM: concentração fungicida mínima

*CFM 50 CFM de um antifúngico capaz de inibir o crescimento de 50% dos Isolados.

**CFM 90 CFM de um antifúngico capaz de inibir o crescimento de 90% dos Isolados

*** v/v: volume por volume em porcentagem

4.7 Valores de CFM 50 e CFM 90 dos óleos essenciais sobre *C. albicans*

Na tabela 19, observam-se os valores de CIM 50 e CIM 90 para os óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus globulus*, *Eugenia caryophyllus*, *Melaleuca alternifolia*, *Thymus vulgaris* sobre *C. albicans*

Tabela 19. Valores CFM 50 e CFM 90 dos óleos essenciais sobre 18 cepas de *C. albicans*

<i>Candida albicans</i>	Concentração Fungicida Mínima (CFM)	
	CFM 50*	CFM 90**
Óleos essenciais	µg/mL - % (v/v)***	µg/ml - % (v/v)
<i>E. citriodora</i>	87,89 – 0,09	175,78 – 0,19
<i>E. globulus</i>	703,12 – 0,78	5625 – 6,25
<i>E. caryophyllus</i>	175,78 – 0,19	703,1 – 0,78
<i>M. alternifolia</i>	1406,50 – 1,56	2812,50 – 3,12
<i>T. vulgaris</i>	87,89 – 0,09	351,56 – 0,39

Condições do estudo: Pesquisa da Concentração inibitória mínima CIM em placas de microdiluição e leitura em 24 horas: resultado em % e µg/mL

Pesquisa da atividade fungistática e fungicida em Ágar Sabouraud dextrose e leitura em 24 horas: presença de crescimento atividade fungistática e ausência de crescimento atividade

CFM: concentração fungicida mínima

*CFM50 CFM de um antifúngico capaz de inibir o crescimento de 50% dos Isolados.

**CFM90 CFM de um antifúngico capaz de inibir o crescimento de 90% dos Isolados

*** v/v: volume por volume em porcentagem

4.8 Sensibilidade de *C. albicans* ao fluconazol e voriconazol

Todos os isolados e cepas padrão de *C. albicans* foram sensíveis ao fluconazol e voriconazol. A média e o desvio padrão da concentração inibitória mínima do fluconazol - CIM foi de $0,31423 \pm 0,18577$ µg/mL e para o voriconazol - CIM foi de $0,04985 \pm 0,07081$ (Tabela 20).

Os valores de CIM 50 e CIM 90 para fluconazol foram de 0,125 e 0,5 µg/mL respectivamente e para voriconazol foram de 0,012 e 0,016 µg/mL respectivamente (Tabela 21).

Tabela 20. Valores da CIM para Fluconazol e Voriconazol sobre *C. albicans*

Amostra	Fluconazol		Voriconazol	
	CIM (µg/mL)	Sensibilidade	CIM (µg/mL)	Sensibilidade
14	0,19	Sensível	0,006	Sensível
19	0,19	Sensível	0,012	Sensível
660	0,125	Sensível	0,012	Sensível
668	0,125	Sensível	0,08	Sensível
686	0,75	Sensível	0,23	Sensível
762	0,16	Sensível	0,002	Sensível
874	0,32	Sensível	0,16	Sensível
938	0,16	Sensível	0,002	Sensível
947	0,16	Sensível	0,002	Sensível
949	0,125	Sensível	0,08	Sensível
954	0,5	Sensível	0,012	Sensível
973	0,16	Sensível	0,002	Sensível
982	0,5	Sensível	0,012	Sensível
993	0,16	Sensível	0,002	Sensível
1009	0,25	Sensível	0,016	Sensível
1026	0,25	Sensível	0,004	Sensível
ATCC 60138	0,38	Sensível	0,012	Sensível
ATCC 90028	0,38	Sensível	0,012	Sensível

Condições do estudo: Pesquisa da Concentração inibitória mínima CIM Para Etest e leitura em 24-48 horas: resultado em µg/mL

*CIM: concentração inibitória mínima

Critérios de interpretação de CIM para fluconazol e voriconazol (documento M27-A2 e M27S2 (CLSI 2013))

Tabela 21. Valores de CFM 50 e CFM 90 do Fluconazol e Voriconazol sobre sobre cepas padrão ATCC 60193 e ATCC 90028 e isolados de *C. albicans*

<i>Candida albicans</i>	Concentração Inibitória Mínima (CIM)	
	CIM 50* µg/mL -	CIM 90** µg/ml
Fluconazol	0,125	0,5
Voriconazol	0,012	0,016

Condições do estudo: Pesquisa da Concentração inibitória mínima CIM Para Etest e leitura em 24 horas: resultado em µg/mL

*CIM: concentração inibitória mínima

Critérios de interpretação de CIM para fluconazol e voriconazol

(documento M27-A2 e M27S2 (CLSI 2013))

5.1 *Candida albicans*

Candida albicans presente na microbiota da pele e mucosa pode levar a manifestações clínicas mais comuns como infecções superficiais, limitadas ao tecido mucoso e/ou cutâneo, com quadros clínicos como as mucosites, esofagites e vaginitis. Pode também promover significativos quadros clínicos de candidíase, em pacientes transplantados, com neoplasias, acometidos pelo vírus HIV, diabéticos entre outros (Carvalho, 2003; Pinto, 2003; Carvalho *et al.*, 2011). E ainda disseminar-se pelo sangue e sistema linfático, alcançando sítios, como o coração, sistema nervoso central, fígado e pulmões (Giolo e Svidzinski, 2010; Araújo *et al.*, 2012),

Um organismo sadio tem a capacidade de manter leveduras como comensal e em equilíbrio perfeito, conservando o número de células dessas leveduras dentro de parâmetros relativamente fixos. No entanto, para ocorrer a doença é necessário que aconteça um desequilíbrio na relação hospedeiro-parasita, isto é que ocorra a ação conjunta de determinantes de patogenicidade / fatores de virulência do microrganismo e as desordens imunológicas do hospedeiro (Pires *et al.*, 2001; Haynes, 2001; Furlamento-Maia *et al.*, 2008; Grubb *et al.*, 2009; Rorig e Colacite, 2009; Sudbery, 2011; Jacobsen *et al.*, 2012; Huang, 2012; Orsonio *et al.*, 2012 e Pupulin, 2014).

A virulência de um microrganismo é definida como a capacidade de produzir doença. Apesar de certos aspectos da virulência serem determinados geneticamente; estes são expressos pelos microrganismos apenas quando existem condições ambientais favoráveis, tais como: teor nutricional, atmosfera de oxigênio e temperatura. Essas condições são específicas para cada microrganismo e podem variar de hospedeiro para hospedeiro e mesmo entre os diferentes tecidos de um mesmo hospedeiro (Ghannoum e Radwan, 1990). Nenhum fator de virulência parece ser responsável individualmente pela patogenicidade, mas provavelmente uma combinação dos diferentes fatores que atuam em determinadas fases da infecção (Cutler, 1991; Natthews, 1994; Odds, 1994; Pires *et al.*, 2001; Biasoli *et al.*, 2002; Sudbery, 2011; Huang, 2012; Mayer *et al.*, 2013).

Fatores de virulência que podem contribuir para a progressão da infecção pela *Candida* podem ser: a capacidade do microrganismo em aderir-se à superfície celular, a variabilidade fenotípica *switching* e a produção de enzimas extracelulares que favorecem a colonização e invasão tecidual (De Bernardis *et al.*, 2001; Naglik *et al.*,

2003).

A adesão é a primeira etapa no processo da colonização e posterior doença nos casos em que ocorre desequilíbrio entre microrganismo e o hospedeiro. Após a adesão do microrganismo, o próximo passo é a invasão e penetração do microrganismo. A capacidade de quebrar as barreiras dos hospedeiros facilita o acesso ao nutriente e promove o crescimento do microrganismo. Todos estes mecanismos aliados aos fatores físicos e enzimáticos, liberados pelas leveduras favorecem o processo infecção (Pires et al., 2001; Haynes, 2001).

A habilidade de transformação morfológica tem sido sugerida como um importante fator relacionando à virulência aumentando a capacidade de aderência do microrganismo (Consolaro et al., 2005). De acordo com Chaffin et al, (1998) essa transformação representa a resposta da levedura as alterações do meio, possibilitando, assim sua adaptação em diferentes nichos biológicos e conseqüentemente a sua disseminação em células humanas. Essa idéia é reforçada ao observar-se a maior produção de enzimas hidrolíticas no processo de formação de hifa, tornando esse fenômeno fundamental na patogênese de *C. albicans* (Ghannoum, 2000; Consolaro et al., 2005; Moreira, 2005; Ganguly e Mitchell, 2011).

A formação do tubo germinativo é observada em espécies do gênero *Candida*, como *C. albicans*. A filamentação da levedura inicia-se com a formação do tubo germinativo que resulta na pseudohifa e hifa verdadeira (Chaffin et al., 1998). A formação de tubo germinativo aumenta a capacidade do microrganismo, se ligar ao tecido do hospedeiro, o que pode explicar a maior incidência de *C. albicans* em relação a outras espécies (Fidel e Sobel, 1996).

Nesta pesquisa foram estudadas duas cepas padrão e 16 isolados biológicos de *C. albicans* de origem humana, desconhecidos quanto ao material biológico de onde foram isolados e gentilmente cedidos pela Faculdade de Odontologia, Disciplina de Estomatologia da Universidade de São Paulo (FO-USP). Na reidentificação todas as cepas padrão e isolados apresentavam tubo germinativo. Mas a formação dessa estrutura foi inibida após contato com os óleos essenciais em doses sub inibitórias, especialmente frente ao óleo essencial de *E. citriodora* onde a inibição ocorreu em 85,72% (6/7) das amostras analisadas, na concentração que variou entre 175,78 a 703,12µg/mL (0,19 a 078%). Gauch *et al.*, (2014) encontraram inibição na formação de tubo germinativo em 100% das amostras de *C. albicans* em contato direto com o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* Linn. na concentração de 4%.

Baseando-se nas diferenças de produção e extensão de franjas das colônias obtidas por meio da semeadura de isolados, em meio de ágar extrato de malte, Phonpaichit et al, (1987), geraram um código de sete dígitos que teoricamente permitia a produção de 100 morfotipos diferentes. Estes autores encontraram um índice de reprodutibilidade de 84% para os isolados idênticos e de 96% para o morfotipo que diferia em um caracter. Hunter et al., (1989) sugerem que este sistema pode correlacionar um morfotipo distinto com a capacidade de virulência, onde franjas descontínuas estão presentes geralmente em isolados de infecção sistêmica fatais. Silva, (1999) observou franjas maiores que 3 mm em 86,5% dos isolados de pacientes com AIDS, enquanto 42,9% dos isolados de indivíduos HIV negativos não apresentaram franjas.

O fenômeno *switching* é reversível, de alta freqüência e permite aos fungos adaptarem-se às diferentes condições ambientais, inclusive ao organismo do hospedeiro (De Bernardis et al., 2001). Este fenômeno é refletido nas diferenças morfológicas existentes nas colônias de *Candida* spp e nas propriedades das superfícies celulares, com conseqüente alteração na aderência às células epiteliais, podendo também determinar a sensibilidade à atividade fungica aos neutrófilos e as drogas antifúngicas (Calderone e Fonzi, 2001).

Baseando-se especialmente nas diferenças de produção e extensão de franjas das colônias obtidas por meio da semeadura de isolados, em meio de ágar extrato de malte, nesta pesquisa obtêve-se morfotipos com franjas contínuas com filamentos paralelos (7) e morfotipos com franjas contínua, somente na periferia ou fios conspícuos em leques (5) e todas com comprimento de 3 a 5 mm (3). Após contato com os óleos essenciais nas doses subinibitórias estes não inibiram a produção de franjas mas alteraram as franjas, que passaram de contínuas com filamentos paralelos (7) para contínua, somente na periferia ou fios conspícuos em leques (5) ou de contínua, somente na periferia ou fios conspícuos em leques (5) para contínuas, com filamentos paralelos (7). Não ocorreu alteração no comprimento da franja (Figuras 9, 11,12,13 e 14). Observou-se também alteração nos códigos que caracterizam os morfotipos entre algumas amostras durante o experimento.

Giammanco et al., (2005), relataram que o tempo de estocagem dos isolados afetam a reprodutibilidade do teste de morfotipagem, pois um teste realizado com isolados estocados há um ano, revelou mudanças nos códigos que caracterizam os morfotipos. De Bernardis et al. (1998) e Giammanco et al. (2005), também relatam

que diferenças nas condições ambientais afetam a expressão de vários genes em *C. albicans*. Se mudanças nas condições ambientais afetam a expressão de vários genes essa possa ser a explicação para as alterações observadas na morfologia das colônias após contato com os óleos essenciais.

C. albicans, como muitos microrganismos patogênicos possuem enzimas hidrolíticas que destroem, alteram ou prejudicam a integridade da membrana celular do hospedeiro, levando a uma disfunção ou interrupção das atividades, uma vez que as membranas contêm lipídeos e proteínas, constituindo-se em alvo do ataque enzimático (Pires, 2001). A produção de exoenzimas reflete o grau de patogenicidade de um microrganismo.

A exoenzima proteinase degrada tecidos do hospedeiro e destroem queratina, colágeno, albumina, fibronectina, hemoglobina e proteínas da matriz extracelular bem como proteínas importantes para o sistema imune, digerindo as imunoglobulinas e parte do sistema complemento no local da infecção (Casadevall & Perfect, 1998). Campos e Baroni (2010), relatam que quanto maior o potencial de virulência manifestado nos diferentes mecanismos dessa virulência utilizados pelo microrganismo, associado a quadros de imunodepressão do hospedeiro, aumenta a possibilidade de penetração da levedura e consequente infecção dos diferentes tecidos do paciente (Pires *et al.*, 1996; 2001; Ombrella *et al.*, 2008; Khumar, 2010; Pupulin, 2014).

A exoenzima fosfolipase atua na hidrólise dos fosfolipídios dando origem a lisofosfolipídios, que causam dano à célula epitelial. (Pires *et al.*, 1996; Santangelo *et al.*, 1999; 2001; Ombrella *et al.*, 2008; Khumar, 2010; Pupulin, 2014). Além disso, destrói substâncias surfactantes nos pulmões, facilitando a adesão da levedura ao tecido (Vidotto *et al.*, 1996; Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009). Pires *et al.*, (2001) e Cotter *et al.* (2013) observaram altas taxas de mortalidade em camundongos inoculados com cepas de *C. albicans*, fortemente produtoras de fosfolipases.

A produção de proteinase e fosfolipase foi avaliada antes e após contato com os óleos essenciais segundo a técnica descrita por Ruchel *et al.* (1982) para proteinase e fosfolipase a técnica descrita por Price *et al.* (1982).

A atividade enzimática da proteinase foi observada pela formação de um halo ao redor da colônia (PZ), decorrente da degradação da albumina bovina fração V na presença de proteinase. PZ é igual à razão entre o diâmetro da colônia (dc) e o

diâmetro da colônia (dc) + diâmetro de degradação (zd) \Rightarrow PZ = dc/dc + zd.

A atividade enzimática da fosfolipase é observada pela formação de um halo de precipitação ao redor da colônia (PZ), decorrente da formação de compostos insolúveis entre o cálcio e fosfolipídios presentes na gema de ovo. PZ é igual à razão entre o diâmetro da colônia (dc) e o diâmetro da colônia (dc) + diâmetro de precipitação (zp) \Rightarrow PZ = dc/dc + zp.

Nesta pesquisa as duas cepas-padrão e 16 isolados biológicos de *C. albicans* de origem humana, quando reidentificadas para o estudo 50% (08/16) foram fortemente produtoras de proteinase, 56,25% (09/16) fortemente produtoras de fosfolipase e 25% (04/16) fortemente produtora para ambas as exoenzimas. Pupulin et al. (2014) relataram em seu estudo que dos 26 isolados de *C. albicans*, 21 (80.8%) apresentaram produção de fosfolipase.

Após contato com o óleo essencial a pesquisa de produção das exoenzimas foi realizada nas concentrações sub-inibitórias nas cepas padrão e em cada isolado testado. Como controle da produção das exoenzimas, isolados sem o contato com o óleo essencial foram avaliados simultaneamente.

Neste estudo observou-se que após contato com os óleos essenciais amostras fortemente produtoras passaram a não produzir, amostras não produtoras foram estimuladas a produzir as exoenzimas enquanto outras não se observou alteração da produção ou mesmo ausência de produção. Estudos já relataram que a produção de exoenzimas pode diminuir dependendo do tempo de isolamento de cada amostra; sendo necessária uma estimulação para que ocorra a produção dessas exoenzimas e com isto pode ocorrer diferenças de resultados nas amostras em diferentes estudos (MacDonald e Odds, 1983; Ghannoum e Abu-Elteen, 1986; Chakrabarti et al., 1991; De Bernardis et al., 1992; Ibrahim et al., 1995; Stewart et al. 1999; Hube e Naglik, 2001; Ribeiro, 2002; Kumar et al., 2006, Mohan e Ballal, 2008; Mayer et al., 2013).

5.2 Antifúngicos sintéticos

O tratamento da candidíase inclui três classes de terapia antifúngica: os azóis, os poliemos e as equinocandinas. Os azóis entre eles o fluconazol tem sido amplamente utilizado para o tratamento de candidíase desde a sua aprovação pelo Food and Drug Administration (FDA)-(USA) em 1990. Os azóis trabalham principalmente inibindo a citocromo P450 – lanosterol, dependente da enzima 14-alfa-

demethylase (Zonios & Bennett, 2008). Esta enzima é necessária para a conversão do lanosterol em ergosterol, um componente vital da membrana celular dos fungos. O fluconazol tem um excelente perfil de segurança e está disponível em formulações intravenosas e oral e agora como genérico. O fluconazol é altamente biodisponível, tornando a administração oral adequada para a maioria dos pacientes (Kauffman, *et al* 2015).

Resistencia de *C. albicans* ao fluconazol foram relatados em vários centros de atendimento terciário e geralmente em pacientes imunossuprimidos que faziam uso do fluconazol como profilaxia (Oxman *et al* , 2010; Pupulin, 2014 e Kauffman, *et al* 2015).

Outros azóis disponíveis incluem voriconazol, posaconazol e itraconazol: A atividade de voriconazol contra espécies de *Candida* é superior à do fluconazol, No entanto, a resistência cruzada entre fluconazol e voriconazol é observada com frequência, especialmente com *C. glabrata* (Kauffman, *et al* 2015).

Voriconazol tem significativamente maior atividade *in vitro* contra isolados de *C. krusei* comparado com o fluconazol por causa da ligação mais eficaz da sua isoenzima citocromo P450 (Kauffman, *et al* 2015).

Cuenca-Estrella *et al* em 2011 relataram que a resistência ao voriconazol não foi comum entre os isolados de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Mais foram freqüentes entre isolados de *Candida glabrata* e *C. krusei*. Relatou ainda que um percentual significativo de isolados resistentes ao voriconazol veio de infecções de orofaringe.

Nesta pesquisa estudou-se dois antifúngicos azóis, fluconazole e voriconazol e todas as amostras foram sensíveis aos dois antifúngicos. Mas, o aumento da resistência aos antifúngicos e a pouca disponibilidade de novos produtos desenvolvidos pela indústria farmacêutica têm motivado vários estudos sobre a atividade de novos produtos com atividade antifúngica.

5.3 Óleos essenciais

Estudos vêm apontando as valiosas propriedades terapêuticas de óleos essenciais de plantas sobre as leveduras patogênicas (Villon & Chaumont, 1994; Carmo *et al.*, 1998; Alves *et al.*, 2000; Araujo, 2004; Lemos *et al.*, 2004; Polachini, 2004; Oliveira, 2005; Lima *et al.*, 2006; Abrahão, 2007; Duarte, 2007; Oliveira, 2007;

Oliveira *et al.*, 2007, Silva, 2007; Lee *et al.*, 2008; Araujo *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2010; Zuzarte *et al.*, 2011; Santos 2011; Toledo, 2013 e Gauch *et al.*, 2014).

Os óleos essenciais constituem os elementos voláteis contidos em diferentes órgãos da planta e estão relacionados com diversas funções necessárias a sua sobrevivência (Oliveira *et al.*, 2006). Bhavanani e Ballow (1992), relataram que cerca de 60% dos óleos essenciais possuem propriedades antifúngicas e 35% exibem propriedades antibacterianas. Os óleos essenciais são originários do metabolismo secundário das plantas e possuem composição química complexa, destacando-se a presença de terpenos e fenilpropanóides (Gonçalves *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2003; Santos, 2011; ; Hammer *et al.*, 2012; Toledo, 2013).

Os terpenos ou terpenóides representam a maior classe de constituintes ativos em plantas, tendo mais de 30.000 substâncias descritas (Raven, 2001; Verpooter e Maraschin; 2001). A classificação dos terpenos decorre do número de unidades isoprênicas que são formadas por átomos de carbono. Os monoterpenos contêm duas unidades isoprênicas (10 átomos de carbonos) são voláteis e encontrados frequentemente nos óleos essenciais (Simões e Spitzer, 1999; Larcher, 2000; Raven, 2001), assim como os sesquiterpenos que constituem uma classe de substâncias naturais com diversos núcleos estruturais (Brochini *et al.*, 1999). Os fatores ambientais na variabilidade de monoterpenos são de grande importância pelo fato dessas substâncias terem significado biossistemático, ecológico e evolutivo no organismo vegetal (Lima *et al.*, 2003).

Os compostos fenólicos de plantas se enquadram em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (Souza *et al.*, 2007; Van Vuuren e Viljoen, 2011; Akolade *et al.*, 2012; Khan e Ahmad, 2012).

Este estudo inicia-se com 5 óleos essenciais e ao final, são dois os óleos essenciais (*E. citriodora* e *T. vulgaris*) com promissora atividade anti- *Candida* para os isolados analisados. Os óleos essenciais escolhidos já haviam sido referidos na literatura com atividade antifúngica, associada ao fato de terem sido extraídos de plantas naturais do país de origem e à disponibilidade dos mesmos na empresa na época do experimento.

5.3.1 Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais

Os óleos essenciais são constituídos por uma mistura complexa de diversas classes de substâncias pertencentes ao metabolismo secundários das plantas. O metabolismo secundário por sua vez pode ser influenciado, dentre outros, por fatores genéticos, climáticos (temperatura, intensidade de luz, efeito sazonal, etc.) e edáficos (Souza et al., 2008; Morais, 2009; Mulyaningsih *et al.*, 2010; Akolade *et al.*, 2012; Elaisse *et al.*, 2012; Carson e Riley, 2012).

Óleos essenciais são freqüentemente extraídos das partes vegetais por meio de arraste à vapor d' água, hidrodestilação ou expressão de pericarpo de frutos cítricos, porém há outros métodos de extração como a enfleurage ou enfloração, extração por CO₂ supercrítico (muito utilizado na indústria) e por solventes orgânicos apolares (não apresentam valor comercial).

Como já relatado a composição química dos óleos essenciais é determinada por fatores genéticos, porém, outros fatores podem acarretar alterações significativas na produção dos metabólitos secundários. Os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente. Os estímulos decorrentes do ambiente, no qual a planta se encontra, podem redirecionar a rota metabólica, ocasionando a biossíntese de diferentes compostos. Dentre estes fatores, ressalta-se as interações planta/microrganismos, planta/insetos e planta/planta; idade e estágio de desenvolvimento, fatores abióticos como luminosidade, temperatura, pluviosidade, nutrição, época e horário de coleta, bem como técnicas de colheita e pós – colheita. Estes fatores podem apresentar correlações entre si, não atuando isoladamente, podendo exercer influência conjunta no metabolismo secundário (Morais, 2009; Mulyaningsih *et al.*, 2010; Akolade *et al.*, 2012; Elaisse *et al.*, 2012; Carson e Riley, 2012).

A temperatura e a luminosidade são relevantes na fotossíntese, pois a interação destes fatores garante um ambiente ideal para o processo fisiológico (Souza et al., 2008). As variações de temperatura são responsáveis pelas alterações na produção de metabólitos secundários. Os óleos essenciais, na maioria das vezes, apresentam um aumento em seu teor quando as plantas produtoras se encontram em ambientes com temperatura elevada, porém, em dias muito quentes, pode-se observar perda excessiva dos mesmos.

A intensidade luminosa influencia a concentração bem como a composição dos óleos essenciais. Como exemplo, o desenvolvimento dos tricomas glandulares (estruturas vegetais que biossintetizam e armazenam o óleo essencial) de *T. vulgaris* são processos dependentes de luz (Morais, 2009; Mulyaningsih *et al.*, 2010; Akolade *et al.*, 2012; Elaisse *et al.*, 2012; Carson e Riley, 2012).

A sazonalidade pode interferir na composição química e no teor de óleo essencial. Kapur *et al.* (1982) observaram que ao destilarem folhas de *E. citriodora* Hk. durante um ano, a intervalos mensais, que a produção de óleo essencial foi mínima durante os meses de inverno (junho e julho), mas que aumentou gradualmente e permaneceu assim até os meses de setembro, outubro e novembro e alcançou o máximo de produção durante os meses mais quentes (dezembro a fevereiro). Observaram que houve um pequeno declínio nos meses de março e abril. Oliveira e Lucchese, 2011 observaram que a variabilidade sazonal interferiu na composição química óleos essenciais da espécie *L. thymoides* bem como na atividade antimicrobiana.

A idade e o estágio de desenvolvimento da planta podem influenciar não apenas a quantidade total de metabólitos secundários produzidos, mas a proporção relativa destes compostos. Tecidos mais jovens geralmente apresentam grande atividade biossintética, aumentando a produção de vários compostos, dentre estes, os óleos essenciais (Morais, 2009).

Com relação ao horário de coleta, ao longo do dia, pode-se observar que o aroma característico de cada planta torna-se mais acentuado, sendo possível acreditar que a concentração de óleos essenciais seja maior naquele período, ou que esteja ocorrendo alteração na proporção relativa entre os componentes deste mesmo óleo essencial. Assim, o horário de coleta das plantas torna-se um aspecto relevante na produção de óleos essenciais. A colheita torna-se o ponto crítico, pois se faz necessário que se defina o momento ideal para a mesma. Todas as pesquisas na área de metabólitos secundários de plantas medicinais deveriam ter como o principal objetivo, coincidir o momento de maior expressão de princípio ativo, neste caso, dos óleos essenciais, com o momento de maior rendimento de fitomassa, obtendo-se assim, o tão esperado sucesso (Mattos, 1996).

Por ser a água essencial à vida e ao metabolismo das plantas, pressupõe-se que em ambientes mais úmidos a produção de metabólitos secundários seja maior, Porém, isto nem sempre ocorre. A deficiência hídrica, caracterizada por diferentes

formas e intensidades, é a principal causa de perda de produtividade (Ortolani & Camargo, 1987), porém, apresenta correlação direta na concentração de metabólitos secundários, havendo relatos na literatura de que o estresse hídrico geralmente induz um aumento na produtividade de alguns terpenoides.

Estudos realizados com o objetivo de avaliar a influência do estresse hídrico sobre a composição do óleo essencial de *Ocimum basilicum* demonstraram que, sob condições de estresse, houve redução no rendimento de massa seca total, ocorrendo, porém, um rendimento de óleo essencial duas vezes maior. Os componentes do óleo essencial apresentaram alterações significativas, havendo redução no percentual de sesquiterpenos e aumento no percentual de linalol e metilchavicol (Simon *et al.*, 1992).

Martins *et al.* (1995), relata que a nutrição é um dos fatores que requerem maior atenção, pois o excesso ou a deficiência de nutrientes pode estar diretamente correlacionado à variação na produção de substâncias ativas. Como exemplo desta variação pode-se citar o fósforo que contribui para o aumento da concentração de óleos essenciais em coentro (*Coriandrum sativum*) e funcho (*Foeniculum vulgare*) Corrêa Jr. *et al.* (1994).

Morais, 2009 observa que a alteração dos compostos majoritários nos óleos essenciais, seja por fatores genéticos, técnicos bióticos ou abióticos, podem influenciar diretamente na qualidade e, conseqüentemente, nos resultados de tratamentos e de testes biológicos sobre patógenos humanos ou fitopatógenos, podendo levar entre, os autores, divergência entre resultados provenientes de ensaios realizados com as mesmas espécies vegetais e patógenos. Para minimizar estes equívocos nos resultados e evitar que dados não conclusivos sejam publicados, o ideal é que, juntamente com os ensaios para verificação da atividade biológica, seja realizada a análise química dos óleos essenciais avaliados, para que se possa obter a caracterização fitoquímica destes.

Pelo exposto neste trabalho fez-se opção por adquirir óleos essenciais comercializados por uma empresa que mostrou se preocupar com a obtenção de matérias-primas vegetais de qualidade, no país de origem da planta, possibilitando com isso a obtenção de óleos essenciais com composição química constante, acarretando resultados de atividades biológicas mais confiáveis. A empresa encaminhou ainda um boletim técnico com a composição química e a frequência desses compostos nos óleos essenciais por ela comercializados e reanalisados quanto a composição neste estudo, conforme anexos 3, 4, 5, 6 e 7. Ressaltamos que em

estudo piloto, esses óleos essenciais analisados frente a *C.neoformans* em diferentes momentos, apresentaram resultados concordantes (Santos, 2011).

5.3.2 Técnicas para os ensaios com óleos essenciais

São várias as metodologias empregadas para a pesquisa da CIM dos óleos essenciais frente as leveduras tais como: difusão em ágar, difusão em disco, macrodiluição e microdiluição em caldo) e as variações individuais como: tamanho do inóculo, temperatura, tempo de incubação e meio de cultura. Pelo exposto a comparação dos valores de CIM entre alguns estudos é dificultada.

A escolha do método de microdiluição em caldo para esta pesquisa deve-se ao fato deste método ser de baixo custo, sem necessidade de equipamentos complexos para leitura, ser mais sensível que outros métodos usados na literatura, requerem pequena quantidade de óleos essenciais e ter boa reprodutibilidade (Ostrosky *et al.*, 2008).

Nascimento *et al.* em 2007 relatam que para uma boa qualidade das análises com óleos essenciais, tornou-se comum a utilização de agentes tensoativos como o Tween 20, Tween 80, e os solventes DMSO e etanol, para dispersão dos óleos essenciais no meio de cultura. As propriedades destes agentes auxiliam na visualização dos resultados da atividade antimicrobiana dos óleos, entretanto podem conduzir a possíveis interações com a substância testada, bem como produzirem atividade antimicrobiana.

Tween (20 e 80): conhecidos como polissorbatos, são tensoativos hidrofílicos solúveis em água e empregados para obter emulsões do tipo óleo e água, como dispersantes ou solubilizantes de óleos. São surfactantes não iônicos, pouco tóxico para as membranas biológicas, constituídos por ésteres de ácidos graxos de polioxietileno sorbitol. Estimulam a secreção de proteínas em microrganismos, além de alterar a morfologia e as superfícies da parede celular tanto de bactérias como de fungos. A relação entre fluidez da membrana e o aumento da secreção de enzimas fúngicas, o Tween facilita a solubilização dessas substâncias em meios aquosos e em solventes orgânicos (Giese *et al.*, 2004; Tan, 2007).

Toledo em 2013 utilizou os tensoativos Tween 20 (polissorbato 20) e Tween 80 (polissorbato 80) e estes não apresentaram atividade fungicida e

fungistática sobre as cepas padrão de *C. albicans*. Já o solvente DMSO apresentou atividade fungicida a 25% v/v (2.500µg/mL). Embora não se tenha observado diferenças dos tensoativos optou-se pelo tensoativo Tween 20 para todos os ensaios, pelo fato da concentração ser a menor entre os dois tensoativos (20% de polissorbato), pela facilidade de homogeneização no meio de cultura e por não apresentar atividade fungicida. Apesar do Tween 80 apresentar os mesmos resultados que o Tween 20, não foi escolhido por se mais concentrado e com isso ser de difícil homogeneização no meio de cultura. Por outro lado Nascimento *et al* em 2007 recomendou a utilização do Tween 20 a 0,02% como emulsificador para os testes com óleo essencial.

5.3.3 Atividade dos óleos essenciais sobre *C. albicans*

Foglio (2003), em um estudo com *Artemisia annua* L., encontrou uma CIM de 1000 µg/mL a 1100 µg/mL para *C.albicans*, nas frações purificadas de deoxiartemisinina e dihidroepioxartenuina. Já Sautour (2004), considerou significativa a atividade antimicrobiana, quando os resultados atingem valores < 200 µg/mL para compostos químicos isolados.

Neste estudo os óleos essenciais que apresentaram maior atividade fungicida com a menor concentração sobre isolados de *C.albicans* foram o óleo essencial de *E. citriodora* que apresentou CFM 90 de 175,75 µg/mL seguido pelo óleo essencial de *T.vulgares* CFM 90 de 351,56 µg/mL e *E. caryophyllus* CFM 90 de 703,1 µg/mL.

O óleo essencial de *E. citriodora* Hooker utilizado neste estudo é composto por 93,99% de citronelal e 2,29% de β-citronelol (Anexo 3), ambos são compostos químicos do grupo dos monoterpenos com atividade fungicida. Outros constituintes frequentemente relatados são os nonoterpenos 1,8-cineol ou eucalyptol (85,84%) e alfa-pineno (9,93%), (Green, 2002; Batish *et al.*, 2008; Gilles *et al.*, 2010; Krobonja *et al.*, 2013; Kirui *et al.*, 2014).

Ramezani *et al.* (2002), Araújo *et al.*, (2004); Bonaldo *et al.* (2007), Dutta *et al.*, (2007), Agarwal *et al.*, (2008) e Kirui *et al.* (2014) relataram atividade antifúngica deste óleo essencial, frente à diversas espécies de leveduras e fungos filamentosos.

Dutta *et al.*, (2007), avaliaram a atividade antifúngica do óleo essencial de *E. citriodora* em cepa de *C. albicans*, utilizando a técnica de disco-difusão em ágar

Saboraud-dextrose e concentração de óleo essencial a 100% observaram halo de atividade equivalente à concentração de 85 µg/mL.

Kirui *et al.* (2014), avaliaram a atividade antifúngica deste óleo essencial em cepa de *C. albicans*, utilizando a técnica de microdiluição e observou CIM igual à 693 µg/mL, valor superior às CFM 50 e CFM 90 encontradas no presente trabalho.

Diferenças nas concentrações podem também ser originadas pela diferença de técnicas utilizadas, uma vez que a difusão pode ser influenciada pelas propriedades físico-químicas do óleo essencial, do meio de cultura e se este for sólido ou líquido. (Nascimento *et al.* (2007), Ostrosky *et al.* (2009); Mendes *et al.* (2012)).

Quanto a atividade das doses subinibitórias sobre os fatores de virulência não foram encontrados trabalhos que avaliassem o efeito deste óleo essencial sobre esses fatores. Agarwal *et al.*, (2008) relataram atividade desse óleo essencial sobre biofilmes de *C. albicans*. Identificando efeitos tóxicos à estrutura e à função da membrana celular pelo eucaliptol e cintronelol, bem como interferindo na síntese e função de enzimas.

O óleo essencial de *E. caryophyllus* Sprengel é conhecido como óleo de cravo, é rico em eugenol, um derivado do grupo dos fenóis. Os compostos químicos do óleo essencial de *E. caryophyllus* são: eugenol (84,10%), β-cariofileno (12,67%), α-cariofileno (1,51%) e acetato de isoeugenol (1,08%) (Anexo 5). O eugenol pertence ao grupo dos fenóis com atividade antimicrobiana e os compostos cariofilenos pertencem ao grupo dos sesquiterpenos com atividade antiinflamatória. (Alma *et al.* (2007), Affonso *et al.* (2012); Mendes *et al.* (2012) e de Sousa *et al.* (2012)).

Budzyńska *et al.* (2013) avaliaram a sensibilidade de 20 isolados biológicos de *C. albicans* e as cepas padrão (ATCC 10231 e ATCC 90028), utilizando a técnica de microdiluição e observaram CIM igual à 185 µg/mL para as cepas ATCC e CIM de 46, 87 a 744,38 µg/mL para os isolados. Neste estudo a CFM 90 foi de 703,1 µg/mL.

O óleo essencial de *Ocimum gratissimum*, popularmente conhecida como alfavaca, o eugenol, principal constituinte do óleo essencial desta planta, foram estudados para verificar a atividade antifúngica sobre *C. neoformans*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum*, utilizando a técnica de diluição em ágar. Como resultados foi observado a atividade sobre *C. neoformans* e *P. brasiliensis*. A análise química desse óleo é constituída por eugenol, timol e terpenóides entre outras substâncias. Já o óleo essencial de *Ocimum basilicum* L. (manjeriço), constituído especialmente por eugenol apresentou atividade antifúngica

sobre *C. albicans* conforme relataram Sartorato et al., 2004; Duarte et al., 2005; Rahimifard et al., 2008 e Lixandru et al., 2010, Estes autores atribuíram esta atividade ao eugenol, presente em plantas do gênero *Ocimum* (Pereira e Maia, 2007) mas não apresentou atividade antimicrobiana frente a *C. albicans* no trabalho realizado por Almeida et al., 2012.

A atividade antimicrobiana a compostos carbonilas e terpenóides, como acetato de terpelina, também tem sido relatado nos trabalhos de Bruneton (1999), Dorman e Deans (2000), Stahl-Biskup e Sa 'ez (2002), Nostro et al. (2004), Pina-Vaz et al. (2004) e Affonso et al. (2012).

Adam et al. (1998), Cox et al. (2000), Portela (2006) e Barbosa (2010) observaram alterações morfológicas relacionadas com a capacidade do acetato de terpenila em deformar a morfologia celular, permeabilizando-a. Carson et al., (2002) relataram que eugenol e carbonilas desregularam o metabolismo protéico celular de *C. albicans*.

Carson et al., (2006) propuseram, com base em seus experimentos, que a atividade inibitória do eugenol estava relacionada com a alteração da respiração mitocondrial e conseqüente produção de energia em bactérias e leveduras, como *C. albicans*. Portela (2006) já relatou que o eugenol inibiu a produção de amilase e protease, além de promover danos à parede celular e lise celular. No caso de terpenos, como o β -citronelol, Cowan et al. (1999) observaram que estes causam desintegração da membrana celular de *C. albicans*.

Os principais compostos químicos do óleo essencial de *E. globulus* Labill são: eucaliptol (80,50%) e limoneno (14,03%) (Anexo 4). Ambos são compostos químicos do grupo dos monoterpenos com atividade fungicida. Neste trabalho a CFM 90 sobre os isolados de *C. albicans* foi de 5625 μ g/mL (6,25%). Fu et al., (2007), avaliaram a atividade antifúngica deste óleo essencial, utilizando a técnica de microdiluição, frente a cepas de *C. albicans* ATCC 18804 e observaram CFM igual à 10 μ g/mL. Bansod e Rai (2008), avaliaram a atividade antifúngica deste óleo essencial frente a cepas de *C. albicans* e *Aspergillus niger* utilizando da técnica de micodiluição em caldo Sabouraud-dextrose, relataram uma CIM igual à 0,12%. Já Castro e Lima (2010) utilizando a mesma técnica encontraram CIM de 312,5 μ g.mL⁻¹ para 76,2% das cepas de *Candida* e CFM de 625 μ g.mL⁻¹ para 81% dessas cepas. Emira et al., (2013) avaliaram a sensibilidade deste óleo essencial sobre cepas de *C. albicans*, utilizando

a técnica de micodiluição em caldo Saboraud-dextrose relataram uma CIM de 0.181 ± 0.006 mg/ml.

Marzoug *et al.*, 2011 relatou que o óleo essencial de *Eucalyptus oleosa* apresentaram atividade antifúngica sobre *C. albicans* (CIM de 0,97%) e o considerou ainda que esta atividade estaria relacionada aos monoterpenos oxigenados e especialmente da substância 1,8-cineol. Esta substância não foi encontrada no óleo essencial utilizado nesse estudo. Atividade do eucaliptol sobre *C. albicans* foi observada nos trabalhos de Juergens *et al.*, 2004; Cha *et al.*, 2007, Serafino *et al.*, 2008 e Mathur *et al.*, 2014.

Não foram encontrados trabalhos que avaliassem o efeito do óleo essencial de *E. globulus* na produção de exoenzimas em doses subinibitórias. Noumi *et al.*, (2010), assim como Emira *et al.*, (2013), observaram inibição na formação do tubo germinativo na presença desse óleo essencial.

Para o óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel, sobre isolados de *C. albicans* a CFM 90 foi de 2812,50 µg/mL (3,12%). Os compostos químicos do óleo essencial de *M. alternifolia* são: terpinoleno (3,38%), γ-terpineno (7,24%) e 4-terpineol (77,15%) (Anexo 6). São compostos químicos do grupo dos monoterpenos com atividade fungicida (Vila e Cañigüeral, 2006).

A literatura relata que este óleo essencial se mostra promissor como agente antifúngico tópico, com dados clínicos indicando eficácia no tratamento da dermatite seborreica (Satchell *et al.*, 2002) e candidíase bucal (Jandourek *et al.*, 1998). Experimentos *in vivo* em modelo animal também indicam eficácia no tratamento de candidíase vaginal (Mondello *et al.*, 2003; Herman *et al.*, 2013). Atividade fungicida em diversas espécies de fungos, incluindo *C. albicans*, foi observada nos trabalhos de Bassett *et al.*, (1990), Jandourek *et al.*, (1998), Christoph *et al.* (2000); D'Auria *et al.* (2001), Griffin *et al.*, (2000), Mondello *et al.* (2003), Hammer *et al.*, (2012) e Budzyńska *et al.* (2013).

Mondello *et al.* (2003) avaliaram a sensibilidade de 65 isolados biológicos de *Candida albicans*, utilizando a técnica de micodiluição e observaram CIM 50 e CIM 90 igual à 250 µg/mL.

Toledo em 2013 utilizando a técnica de micodiluição em caldo e estudando 66 isolados biológicos de *C. albicans* da mucosa bucal não encontrou isolados resistentes ao óleo essencial de *M. alternifolia*, a CFM 90 foi de 1250µg/mL (1,56%). Os principais componentes encontrados no óleo no estudo de Toledo, 2013 foram γ-

terpineno (19,72%) e 4-terpineol (38,12%). Neste estudo a CFM 90 foi de 2812,50 µg/mL(3,12%) e a composição foi de γ-terpineno (7,24%) e 4-terpineol (77,15%).

O óleo essencial, apresentou composição majoritária por 4-terpineol e γ-terpineol. O óleo essencial contém aproximadamente 100 componentes ativos, sendo a maioria monoterpenos, sesquiterpenos e álcoois relacionados. Os principais constituintes são os compostos terpinen-4-ol, 1,8-cineol, α-terpineno, γ-terpineno, α-pineno, β-pineno, α-terpineol, p-cimeno e álcoois sesquiterpênicos, que representam cerca de 90% do óleo (Hammer *et al.*, 2012; Emira *et al.*, 2013).

Variações nesses resultados podem ser justificadas pela variação da composição química do óleo essencial de *M. alternifolia*, como apontado nos trabalhos de Hammer *et al.*, (2012), Emira *et al.* (2013), Budzyńska *et al.* (2013) e Herman *et al.* (2013). Simões *et al.* (1999), Carson *et al.* (2006) e Hammer *et al.* (2014) relataram que um óleo de boa qualidade contém quantidades iguais ou superiores a 2 e 5% de cineol e entre 40 a 47% de terpinenol.

Não foram encontrados trabalhos que avaliassem o efeito desse óleo essencial na produção de exoenzimas em doses subinibitórias. No estudo de Carson *et al.*, (2002), observou-se que a formação do tubo germinativo foi completamente inibida na presença de 0,25 e 0,125% do óleo, sendo observado ainda que tratamento com concentração em 0,125% resultou numa tendência dos blastoconídios mudarem de morfologia, de brotamento simples para gêmulas multibrotantes, durante o período de teste de 4 h. Estas células estavam crescendo ativamente, mas não se formaram tubos germinativos. As células foram capazes de formar tubos germinativos, após a remoção do óleo essencial.

Inouye (1998) observou que a respiração celular foi inibida em cerca 95% após o tratamento com 1,0% de óleo essencial, e cerca de 40% após tratamento com 0,25% deste. Hammer *et al.*, (2004), Hammer *et al.*, (2012) e Emira *et al.*, (2013) observaram que a fluidez da membrana das células de *C. albicans* tratadas com o óleo essencial é significativamente aumentada, confirmando a atividade desse óleo essencial na membrana plasmática.

A atividade fungicida foi atribuída ao dano na membrana plasmática e/ou mitocondrial ocasionados por alguns compostos, incluindo-se 4-terpineol e cinenol, conforme relatado por Jandourek *et al.*, (1998), Christoph *et al.*, (2000), D'Auria *et al.* (2001), Mondello *et al.* (2003) e Hammer *et al.*, (2012). O óleo essencial também inibiu o mecanismo respiratório em forma dose-dependente no trabalho de Cox *et al.* (2000).

Segundo Cox *et al.* (2000), compostos como o 4-terpineol estão relacionados com a inibição da respiração oxidativa, indução da deformação da membrana (dilatação) tendo como conseqüências mudanças na permeabilidade e na atividade enzimática.

Hammer *et al.*, (2004) relataram que o óleo essencial de *M. alternifolia* também induziu a acidificação do meio, devido à expulsão de proton ATPase de membrana plasmática, que é alimentada por ATP derivado da mitocôndria. Carson *et al.*, (2002) e Hammer *et al.*, (2012) observaram a atividade inibitória do eugenol sobre a respiração mitocondrial e conseqüente produção de energia.

O óleo essencial de *T. vulgaris* foi avaliada frente a cepas de *C. albicans* (ATCC 10231) por Sartorato *et al.* (2004) e Duarte *et al.* (2005), onde obtiveram a CIM de *T. vulgaris* frente à mesma cepa no valor de 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ e Rahimifard *et al.* (2008) encontraram CIM de 0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$. No estudo de Almeida *et al.*, 2012 o óleo essencial de *T. vulgaris* não produziram inibição sobre o crescimento das leveduras mesmo diante da concentração inicial empregada (1024 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$), não apresentando similaridade com os resultados apresentados por Sartorato *et al.* (2004), Duarte *et al.* (2005) e Rahimifard *et al.* (2008). Bruneton (1999), Pina-Vaz *et al.* (2004), Pinto *et al.* (2006), Stahl-Biskup e Sáez (2002) e Ahmad *et al.*, (2014) também relataram a atividade antifúngica desse óleo esencial.

Neste estudo, óleo essencial de *T. vulgaris* apresentou CFM 90 de 351,56 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Nzeako e Lawati (2008) avaliaram a sensibilidade de uma cepa padrão de *C. albicans* (ATCC 10231), utilizando a técnica de microdiluição em caldo Sabouraud-dextrose observaram CFM de 460 à 930 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Živković *et al.* (2013) avaliaram a sensibilidade de isolados biológicos de *Candida* (10 de *C. albicans*, 2 de *C. glabrata*, 3 de *C. krusei*, 1 de *C. parapsilosis* e 1 de *C. tropicalis*), utilizando a técnica de microdiluição e observaram CFM de 500 à 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ambos os trabalhos apresentaram valores superiores às CFM 50 e CFM 90 encontradas no presente trabalho.

Almeida *et al.*, 2012 relatam ainda que a ausência de inibição no crescimento de leveduras frente ao óleo essencial de *T. vulgaris*, mesmo nos achados que utilizaram a mesma cepa de *C. albicans*, podem ser atribuídas às condições climáticas e disponibilidade de água no solo, que afetam o metabolismo secundário da espécie vegetal, podendo alterar a composição dos óleos essenciais, de mesma espécie, nas diferentes estações do ano (Freire *et al.*, 2006). Ainda relacionado a este fato, pode-se observar que os estágios fenológicos e ciclo de reprodução podem interferir na

concentração dos fitoconstituintes (Carvalho et al., 2008).

No óleo essencial de *T. vulgaris* Lin utilizados neste estudo foram detectados nove compostos químicos entre eles os que apresentaram maiores concentrações foram timol (62,13%), cimeno (14,43%) e carvacrol (5,08%) (Anexo 7). Venskutonis (1997), Hudaib et al. (2002), Omran et al (2010), assim como Živković et al. (2013), ao analisarem os constituintes do óleo essencial, encontraram cerca de 68 a 98 compostos, sendo os constituintes majoritários monoterpenos e compostos fenólicos como timol.

Bruneton (1999); Stahl-Biskup e Sa'ez (2002), Pina-Vaz et al. (2004), Pinto et al. (2006), Omran et al., (2010), De Lira et al. (2012), Nguéfacq et al. (2012) e Budzyńska et al. (2013) relataram que a atividade antimicrobiana desse óleo é derivada de compostos fenólicos na sua composição e a ocorrência limitada destes fenóis na natureza é uma das razões pelas quais os óleos contendo timol e carvacrol têm sido de grande interesse científico.

Hudaib et al., 2002 também relatam que o timol e carvacrol são os principais monoterpenos existentes no óleo essencial de tomilho, compostos fenólicos que possuem atividade antimicrobiana. O cimeno é um composto químico do grupo dos monoterpenos e possui atividade antimicrobiana contra *Salmonella Enteritidis* (Silva et al., 2010). Segundo Burt (2004), o cimeno facilita o transporte do carvacrol através da membrana citoplasmática para o interior da célula bacteriana. Klaric et al em 2007 relatou atividade fungicida do óleo essencial de *T. vulgaris* sobre espécies de *Aspergillus*.

No óleo essencial de *T. vulgaris*, o carvacrol, tem sido citado como indutor de células apoptóticas no carcinoma hepatocelular (Yin et al., 2012). Além disto, alguns óleos essenciais e extratos, pertencentes a espécies da família Lamiaceae são relatados como antioxidantes. Assim, intensifica-se a pesquisa a cerca de tais substâncias potencialmente empregadas na indústria alimentícia (Mauritti e Bragagnolo, 2007). A atividade antifúngica do carvacrol e timol, isolados de *T. viciosoi*, foi avaliada frente a cepas de *C. albicans*. O estudo de Vale-Silva et al. (2010) demonstrou que a concentração inibitória mínima e fungicida mínima variaram entre 0,04 a 0,64 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, demonstrando potencial antifúngico. Neste estudo, óleo essencial de *T. vulgaris* 62,13% de timol e 5,08% de carvacrol.

Não foram encontrados trabalhos que avaliassem o efeito deste óleo essencial na produção de exoenzimas, produção de tubo germinativo e

clamidoconídeos. Pinto *et al.* (2006) utilizou citometria de fluxo para avaliar o efeito do óleo essencial de *T. vulgaris* e *T. pulegioides* na integridade das células fúngicas de espécies de *Candida* e *Aspergillus*. Obteve como resultados uma lesão primária da membrana por atividade do óleo, sendo dependente da dose. Este trabalho, também, observou redução da composição de ergosterol, à semelhança da atividade de compostos azólicos. Esta similaridade de atividade também foi relatada por Ahmad *et al.* (2010), o qual também observou o sinergismo das moléculas metil-eugenol e eugenol com fluconazol sobre *C. albicans*.

Desestabilização da membrana, com permeabilização e perda de ATP, promovidas pelo timol e carvacrol foram observadas por Lambert *et al.* (2001), Pina-Vaz *et al.* (2003), Salgueiro *et al.* (2004), Barbosa, (2010) e De Lira *et al.* (2012) e pelos compostos fenólicos como timol, p-cimeno e carvacrol por (Lambert *et al.*, 2001; Barbosa, 2010; Shabnum eWagay, 2011; Živković *et al.*, 2013).

Os óleos essenciais de *E. citriodora* que tem monoterpenos na sua composição química e *T. vulgaris* que apresentam compostos fenólicos são os que apresentaram maior atividade fungicida com a menor concentração sobre isolados de *C. albicans*.

Espera-se com esta pesquisa ter contribuído com mais um produto natural com atividade antifúngica sobre *C. albicans*.

6 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos e nas condições em que foi conduzido o presente estudo, pode-se concluir que:

- Os óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora* e *Thymus vulgaris*, apresentaram atividade fungicida sobre *C. albicans*, com as menores concentrações inibitórias em relação aos óleos essenciais de *Eucalyptus globulus*, *Eugenia caryophyllus* e *Melaleuca alternifolia*,
- Com excessão do óleo essencial de *M. alternifolia*, os óleos essenciais que alteraram a produção do tubo germinativo e clamidoconídios também alteraram a produção de franjas.
- Todos os óleos essenciais alteraram a produção das exoenzimas proteinase e fosfolipase de *C.albicans*
- Todos os isolados e cepas padrão de *C. albicans* foram sensíveis aos antifúngicos fluconazol e voriconazol.
- As concentrações fungicidas mínimas do fluconazol e voriconazol foram menores que as CFM 90 dos óleos essenciais de *Eucalyptos citriodora* e *Thymus vulgaris*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrahão DS. Atividade dos extratos de própolis sobre o comportamento morfológico de *Candida albicans* e como medicação intracanal [Dissertação]. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças – Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2007.

Abrantes MR, Lima EO, Medeiros MAP, Menezes CP, Guerra FQS, Milan EP. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre leveduras *Candida* não *albicans*. Rev Bras Farm. 2013; 94 (3): 227 – 233.

Adam K, Sivropoulou A, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M. Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. J Agric Food Chem. 1998; 46: 1739–1745.

Affonso RS, Renno MN, Slana GBCA, França TCC. Aspectos Químicos e Biológicos do Óleo Essencial de Cravo da Índia. Revista Virtual Química. 2012; 4 (2): 146-161.

Agarwal V, Lal P, Pruthi V. Prevention of *Candida albicans* biofilm by plant oils. Mycopathologia. 2008; 165: 13-19.

Ahmad A, van Vuuren S, Viljoen A. Unravelling the Complex Antimicrobial Interactions of Essential Oils — The Case of *Thymus vulgaris* (Thyme). Molecules. 2014; 19: 2896-2910.

Akolade JO, Olutayo O, Afolayan MO, Akande SA, Idowu DI. Chemical composition, antioxidant and cytotoxic effects of *Eucalyptus globulus* grown in north-central Nigeria. J Nat Prod Plant Resour. 2012; 2: 1–8.

Albuquerque P, Casadevall A. *Quorum* sensing in fungi--a review. Med Mycol. 2012; 50: 337-45.

Alma MH, Ertaş M, Nitz S, Kollmannsberger H. Chemical composition of content of essential oil from the bud of cultivated Turkish Clove. Bio Res. 2007 2: 265-269.

Almeida OP, Scully P. Fungal infections of the mouth. Braz J Oral Sci. 2002; 1: 19-26.

Almeida, LFD; Cavalcanti,YW.; Castro RD.; Lima,E.O Atividade antifúngica de óleos essenciais frente a amostras clínicas de *Candida albicans* isoladas de pacientes HIV positivos. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, 2012 v.14, n.4, p.649-655.

Almirante B, Rodrigues D, Park BJ. Epidemiology and predictor of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. Journal of Clinical Microbiology. 2005; 43: 1829-1835.

Alves TMA. *et al.* Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 2000; 95(3): 367-73.

Amiri A, Dugas R, Pichot AL, Bompeix G. *In vitro* and *in vivo* activity of eugenol oil (*Eugenia caryophyllata*) against four important postharvest apple pathogens. International Journal of Food Microbiology. 2008; 126: 13-19.

Andrade AM, Gomes SS. Influência de alguns fatores não genéticos sobre o teor de óleo essencial em folhas de *Eucalyptus citriodora* Hook. Flores e Ambiente. 2000, 7(1): 181–189.

Araújo FM, Passo MGVM, Lima EO, Roque NF, Guedes MLS, Souza-Neta LC et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from *Poiretia bahiana*C. Müller (Papilionoideae – Leguminosae). J. Braz. Chem. Soc. 2009; v. 00, n. 00, 1-6.

Araújo SM, Fontes CJF, Leite JDP, Hahn RC. Fungal agents in different anatomical sites in public health services in Cuiabá, state of Mato Grosso, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 2012, 54: 5-10.

Araújo JCLV, Lima EO, Ceballos BSO, Freire KRL, Souza EL, Filho LS. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. Revista de Patologia Tropical. 2004; 33: 55-64.

Arras G, Usai M. Fungitoxic activity of essential oils against four postharvest citrus pathogens: chemical analysis of *Thymus capitatus* oil and its effect in subatmospheric pressure conditions. *J Food Prot.* 2001; 64(7): 1025-9.

Azerêdo GA, Stamford, TLM, Figueiredo RCBQ, Souza EL. The Cytotoxic Effect of Essential Oils from *Origanum vulgare* L. and/or *Rosmarinus officinalis* L. on *Aeromonas hydrophila*. *Food Borne Pathogens and Disease.* 2012; 9 (4): 298-304.

Bagamboula CF, Uyttendaele M, Debevere J. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Micro., Ghent, Belgium.* 2004; 21: 33-42.

Barberino MG. Evaluation of blood stream infections by *Candida* in three tertiary hospitals in Salvador, Brazil: a case-control study. *Brazilian Journal of Infectious Diseases.* 2006; 10: 36-40.

Barbosa LN. Propriedade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas condimentares com potencial de uso como conservante em carne e hambúrguer bovino e testes de aceitação. [Dissertação]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências; 2010.

Bansod S, Rai M. Antifungal Activity of Essential Oils from Indian Medicinal Plants Against Human Pathogenic *Aspergillus fumigatus* and *A. niger*. *World J Med Sci.* 2008; 3: 81 - 88.

Bassett IB, Pannowitz, DL, Barnetson RS. A comparative study of tea-tree oil versus benzoylperoxide in the treatment of acne. *Med. J. Aust.* 1990; 153: 455–458.

Batish DR., Slingh HP, Kohli RK., Kaur S. *Eucalyptus* essential oil as a nature pesticide. *Forest Ecology and Management.* 2008; 256 (12): 2166-2174.

Behnia M et. al. Inhibitory effects of Iranian *Thymus vulgaris* Extracts on in vitro growth of *Entamoeba histolytica*. *Korean Journal of Parasitology,* 2008; 46(3):153-156.

Bhavanani SM, Ballow CH. New agents for Gram-positive bacteria. *Curr Opin Microbiol.* 1992; 13: 528-534.

Boland DJ., Brooker MH, Chippendale GM *et al.* *Forest trees of Australia.* 4^o ed. Melbourne: CSIRO; 1994.

Bonaldo SM, Schwan-Estrada KRF, Stangarlin JR, Cruz MES, Fioritutida ACG. Contribuição ao estudo das atividades antifúngica e elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja por eucalipto (*Eucalyptus citriodora*). *Summa Phytopathologica.* 2007; 33 (4): 383-387.

Braga PC, Alfieri M, Culici M, Dal Sasso M. Inhibitory activity of thymol against the formation and viability of *Candida albicans* hyphae. *Mycoses.* 2007; 50: 502-506.

Brochini CB, Nunez CV, Moreira IC, Roque NF, Chaves MH, Martins D. Identificação de componentes de óleos voláteis: análise espectroscópica de misturas de sesquiterpenos. *Quim Nova.* 1999; 22: 37-40.

Bruneton J. *Terpènes et steroids, huiles essentielles.* Pharmacognosie. Paris: Éditions Tec & Doc & Éditions Médicales Internationals. 1999.

Budzyńska A, Sadowska B, Lipowczan G, Maciąg R, Kalembe D, Różalska B. Activity of Selected Essential Oils against *Candida* spp. strains. Evaluation of New Aspects of their Specific Pharmacological Properties, with Special Reference to Lemon Balm. *Advances in Microbiology.* 2013; 3: 317-325.

Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. *International Journal of Food Microbiology.* 2004; v. 94, n. 3, p. 223-253.

Calderoni RA., Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiol.* 2001; 9: 327-35.

Campos FL, Baroni FA. Isolados de *Cryptococcus neoformans*, *C. gatti* e *C. laurentii* produtores de Protease e Fosfolipase. *Ver de Patologia Tropical.* 2010; 39(2): 83–89.

Carlini EA *et al.* Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). Effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals. J Ethnopharmacol. 1986; 17: 37-64.

Carmo CMF, Lima EO, Milan EP. Atividade antifúngica de extratos de óleos essenciais contra *Candida albicans* isolada de pacientes com Aids. Ver Bras Farm. 1998; 79: 108 – 111

Carreto CFP, Navas EAFA, Paradella TC, Oliveira LD, Junqueira JC, Jorge AOC. Efeitos do chá de tomilho sobre a aderência *in vitro* de *Streptococcus mutans* ao esmalte dentário e *Candida albicans* à resina acrílica. Ver Odont UNESP. 2007; 36 (3): 281–286.

Carson C.F, Mee B.J, Riley T.V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2002; 46: 1914–1920.

Carson CF, Hammer K. A, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. Clin Microbiol Rev. 2006; 19 (1): 50. 50-62.

Carvalhinho S, Costa AM, Coelho AC., Martins E, Sampaio A. Susceptibilities of *Candida albicans* Mouth Isolates to Antifungal Agents, Essentials Oils and Mouth Rinses, Mycopathologia. 2012; 174: 69–76.

Carvalho JCT. Fitoterápicos – aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. São Paulo: Editora Tecmedd; 2004.

Carvalho, T.M. et al. Verification of the antibacterial activity in vitro of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* and *Rosmarinus officinalis* in bacteria which cause infections of the urinary tract. Revista Brasileira de Análises Clínicas, v.42, n.3, p.213-5, 2010

Casadevall, A, Perfect J R. *Cryptococcus neoformans*. Washington, DC. ASM Press; 1998

Castro DP, Cardoso MG, Moraes JC, Guerreiro MC, Muniz FR, Baliza DP. Identificação química do óleo essencial de *Achillea millefolium* e *Thymus vulgaris*. Con Bras de Quím. 2003; 63: 432.

Castro RD, Lima EO. Atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* L. sobre *Candida* spp. Rev Odontol UNESP. 2010; 39: 179-184.

Chakrabarti A, Nayak N, Talwar P *et al.* *In vitro* proteinase production by *Candida* species. Mycopathology. 1991; 114: 163-68.

Cha JD, Jung EK, Kil BS, Lee KY. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oil from *Artemisia feddei*. Journal of Microbiology and Biotechnology. 2007; 17: 2061-2065.

Chaffin WL, López-Ribot JL, Casanova M *et al.* Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. Microbiol Mol Biol Rev. 1998; 62: 130-80.

Chami N, Chami F, Bennis S, Trouillas J, Remmal A. Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. Braz J Infect Dis. 2004; 8 (3): 217-226.

Cheng S, Clancy CJ, Checkley MA., Handfield M, Hillman JD, Progulske-Fox A, Lewin AS, Fidel PL., Nguyen MH. Identification of *Candida albicans* genes induced during thrush offers insight into pathogenesis. Molecular Microbiology. 2003; 48 (5): 1275–1288.

Colombo, AL, Tobon A, Restrepo A. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. Med. Mycol. 2011; 49 (8): 785–98.

Costa ACBP, Pereira CA, Freire F, Junqueira JC, Jorge AOC. Atividade antifúngica dos extratos glicólicos de *Rosmarinus officinalis* Linn. e *Syzygium cumini* Linn. sobre cepas clínicas de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*. Revista de Odontologia da UNESP. 2009; 38 (2): 111-116.

Costa ACBP, Rodrigues TG, Ferreira TM, Silva FS, Aguida M, Khouri S. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* sobre leveduras isoladas de candidíase bucal de gestantes HIV positivas. Rev Inst Adolfo Lutz. 2010; 69(3): 403 – 407.

Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews. 1999; 12: 564-582.

Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bel HC, Gustafson JE, Warmington JR., Wyllie SG. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). J Appl Microbiol. 2000; 88: 170-175.

Craveiro AA., Queiroz DC. Óleos essenciais e Química Fina. Química Nova. 1993; 16 (3): 224-228.

Crissey JT, Lang H, Parish LC. Manual of Medical Mycology. Cambridge: Blackwell Science. 1995.

Christoph F, Kaulfers PM., Stahl-Biskup E. A comparative study of the *in vitro* antimicrobial activity of tea tree oils with special reference to the activity of triketones. Planta Med. 2000; 66: 556–560.

Cuenca-Estrella,M; Gomez-Lopez,A; Cuesta,I; Zaragoza, O; Mellado,E and Rodriguez-Tudela J.L. Frequency of Voriconazole Resistance *In Vitro* among Spanish Clinical Isolates of *Candida* spp. According to Breakpoints Established by the Antifungal Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antimicrob. Agents Chemother. April 2011 vol. 55 no. 4 1794-1797

Cury AE, Hirschfeld MPM. Interactions between amphotericin B and nitroimidazoles against *Candida albicans*. *Mycoses*. 1997; 40: 187-192.

Cury AE. Resistência a antifúngicos. In: *Compêndio de Micologia Médica*. Rio de Janeiro: Medsi; 1998. p 413-421.

Cunha AP, Silva AP, Roque OR. Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia. In: *Serviço de Educação e Bolsas*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 2003. p 314–315.

Cutler JE. Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu. Rev. Microbiol.* 1991; 45: 187-218.

D'Auria FD, Laino L, Strippoli V, Tecca M, Salvatore G, Battinelli L, Mazzanti G. *In vitro* activity of tea tree oil against *Candida albicans* mycelial conversion and other pathogenic fungi *J Chemother.* 2001; 13: 377–383.

De Bernardis F, Boccanera M, Rainaldi L *et al.* The secretion of asparthyl proteinase, a virulence enzyme, by isolates of *Candida albicans* from the oral cavity of HIV-infected subjects. *Eur J Epidemiol.* 1992; 8: 362-67.

De Lira MKS, De Oliveira PF, De Oliveira WA., Lima IO, De Oliveira LE. Antifungal activity of *Thymus vulgaris* L. essential oil and its constituent phytochemicals against *Rhizopus oryzae*: Interaction with ergosterol. *Molecules.* 2012; 17: 14418–14433.

Dorman HJ, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol.* 2000; 88: 308–316.

Duarte ESM. Crescimento e teor de óleo essencial em plantas de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus globulus* tratadas com homeopatia. [Tese]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, MG; 2007.

Duarte MCT, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VL, Delarmelina C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 2005; 97: 305-411.

Dudareva N, Pichersky E, Gershenzon J. Biochemistry of plant volatiles. *Plant. Physiol.* 2004; 135: 893-902.

Dupont, B.F., Dromer, F., Improvisi, L. The problem of resistance to azoles in *Candida*. *J Mycol Med* 1996;6 (Suppl. II):12-9.

Dutta BK, Karmakar S, Naglot A, Aich JC, Begam M. Anticandidial activity of some essential oils of a mega biodiversity hotspot in India. *Mycoses.* 2007; 50 (2): 121-124.

Dzamic A, Sokovic M, Ristic MS, Grijic-Jovanovic S, Vukojevic J, Marin PD. Chemical composition and antifungal activity of *Illicium verum* and *Eugenia caryophyllata* essential oils. *Chemistry of Natural Compounds.* 2009; 45 (2): 269-271.

Edmond MB. Nosocomial Bloodstream Infections in United State Hospitals: A Three-Year Analysis. *Clinical Infectious Diseases.* 1999; 29: 239-244.

Edwards JE, Filler SG. Current strategy for treating invasive candidiasis: emphasis on infections in nonneutropenic patients. *Clin Infect Dis.* 1992; 14: 106-113.

Elaissi A, Rouis Z, Mabrouk S, Bel Haj Salah K, Mahjoub A, Khouja ML, Farhat F, Chemli R, Harzallah-Skhiri F. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils from fifteen *Eucalyptus* species growing in the Korbous and Jbel Abderrahman Arboreta (North East Tunisia). *Molecules.* 2012; 17: 3044–3057.

Emira N, Mejdí S, Aouni M. *In vitro* activity of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree) and *Eucalyptus globulus* essential oils on oral *Candida* biofilm formation on polymethylmethacrylate. *Journal of Medicinal Plants Research.* 2013;. 7 (20): 1461-1466.

Ferreira SH. Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências; 1998.

Fidel PL, Sobel JD. Immunopathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. Clin. Microbiol. Rev. 1996; 9: (3) 335-348.

Freire, C.M.M. et al. Effects of seasonal variation on the central nervous system activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. Journal of Ethnopharmacology, v.105, n.1/2, p.161-6, 2006.

Frutuoso AE, Nascimento NT, Lemos TLG, Coelho EL, Teixeira DMA. Óleos essenciais aplicados em alimentos: uma revisão. Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos. 2013; 4 69-81.

Fu YJ, Zu YG, Chen LY, Shi XG, Wang Z, Sun S, Efferth T. Antimicrobial Activity of Clove and Rosemary Essential Oils Alone and in Combination. Phytother Res. 2007; 21: 989 - 994.

Furlameto-Maia L *et al.* *In vitro* evaluation of putative virulence attributes of oral isolates of *Candida* spp. Obtained from elderly healthy individuals. Mycopathologia. 2008; 166: 209-17.

Gacser A *et al.* Targeted gene deletion in *Candida parapsilosis* demonstrates the role of secreted lipase in virulence. J Clin Invest. 2007; 117: 3049-958.

Ganguly S, Mitchell AP. Mucosal biofilms of *Candida albicans*. Curr.Opin.Microbiol. 2011; 14: 380–385.

Gauch LMR, *et al.* Antifungal activity of *Rosmarinus officinalis* Linn. essential oil against *Candida*. Rev Pan-Amaz Saude 2014; 5(1):61-66

Gazim ZC. Antifungal activity of the essential oil from *Calendula officinalis* L. (*asteraceae*) growing in Brazil. Braz. J. Microbiol. 2008; 39 (1): 61-63.

Giese EC, Covizzi LG, Dekker RFH, Barbosa AM. Influência de Tween na produção de lacases constitutivas e indutivas pelo *Botryosphaeria* sp. Acta Scientiarum. Biological Sciences. 2004; 26(4): 463-470.

Ghannoum M, Abu-Elteen K. Correlative relationship between proteinase production, adherence and pathogenicity of various strains of *Candida albicans*. J Med Vet Mycol. 1986; 24 (5): 407-13.

Giammanco GM, Lopes MM, Coimbra RS, Pignato S, Grimont PAD, Grimont F, Freitas G, Giammanco G. Value of morphotyping for the characterization of *Candida albicans* clinical isolates. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005; 100 (5): 483-490.

Gilles M, Zhao J, An M, Agboola S. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species. Food Chem. 2010; 119 (2): 731–737.

Giolo MP, Svidzinski TIE. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. J Bras Patol Med Lab. 2010; 46 (3): 225-234.

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. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. 2003; 6:8-14.

Graybill JR. Future directions of antifungal chemotherapy. Clin Infect Dis. 1992; 14: 170-181.

Green C. Export development of essential oils and spices by Cambodia. In: Kent: C. L. Green Consultancy Services. 2002.

Griffin SG, Markham JL, Leach DN. An agar dilution method for the determination of the minimum inhibitory concentration of essential oils. J. Essent Oil Res. 2000; 12: 249–255.

Grubb SEW. Adhesion of *Candida albicans* to Endothelial Cells under Physiological Conditions of Flow. Infect. Immun. 2009; 77: 3872-3878.

Gudlaugsson O. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. Clin Infect Dis. 2003; 37: 1172-1177.

Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oil and the major monoterpene component terpinen-4-ol on the development of single and multistep antibiotic resistance and antimicrobial susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56: 909–915.

Hammer KA, Carson CF, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil inhibits germ tube formation by *Candida albicans*. *Med Mycol.* 2000; 38 (5): 355-62.

Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 53: 1081–1085.

Herman A, Herman AP, Domagalska BW, Hertwig A. Essential Oils and Herbal Extracts as Antimicrobial Agents in Cosmetic Emulsion. *Indian J Microbiol.* 2013; 53 (2): 232–237.

Hinrichsen SL. *Candida* isolates in tertiary hospitals in northeastern Brazil. *Braz J Microbiol.* 2009; 40 (2): 325-328.

Hostetter MK. Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida* spp. with epithelial and endothelial surfaces. *CLinneaus Microbiol.* 1994; 7: 29-42.

Huang G. Regulation of phenotypic transitions in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Virulence.* 2012; 3 (3): 251–261.

Hube B, Naglik J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology.* 2001; 147 (8): 1997-2005.

Hudaib M, Speroni E, Pietra AMD, Cavrini V, CG/EM evaluation of thyme (*Thymus Vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2002; 29: 691–700.

Hunter P, Fraser C. Application of a numerical index of discriminatory power to a comparison of four physicochemical typing methods for *Candida albicans*. J Clin Microbiol. 1989;27(10):2156-6210.

Ibrahim AS *et al.* Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. Infect Immun. 1995; 63: 1993-1998.

Inouye S, Watanabe M, Nishiyama Y, Takeo K, Akao M, Yamaguchi H. Antisporulating and respiration-inhibitory effects of essential oils on filamentous fungi. Mycoses. 1998; 41: 403–410.

Jacobsen ID, Wilson D, Wächtler B, Brunke S, Naglik JR, Hube B. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. Expert Rev Anti Infect Ther. 2012; 10: 85-93.

Jakiemiu EAR. Uma contribuição ao estudo do óleo essencial e do extrato de tomilho (*Thymus vulgaris* L.). [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos; 2008.

Jandourek A, Vaishampayan JK, Vazquez JA. Efficacy of *Melaleuca* oral solution for the treatment of fluconazole refractory oral candidiasis in AIDS patients. AIDS. 1998; 12: 1033-7.

Jordan MJ, Martinez RM, Goodner KL, Baldwin EA., Sotomayor JA.. Seasonal variation of *Thymus hyemalis* Lange and Spanish *Thymus vulgaris* L. essential oils composition. Industrial Crops and Products. 2006; 24: 253-263.

Juergens UR, Engelen T, Racke K. Inhibitory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) on cytokine production in cultured human lymphocytes and monocytes. Pulm Pharmacol Ther. 2004; 17: 281-287.

Kam AP, Xu J. Diversity of commensal yeasts within and among healthy hosts. Diag Microbiol and Infect Dis. 2002; 43: 19-28.

Kaminishi H, Mihashi H, Tamaki T *et al.* Degradation of humoral host defense by *Candida albicans* protease. *Infect Immun.* 1995; 63 (3): 984-988.

Kapur KK; Vashist VN; Atal CK. Variability and utilization studies on *Eucalyptus citriodora* Hooker. grown in India. In: Atal CK; Kapur BM. (eds). Cultivation and utilization of aromatic plants. Jammu-Tawi: Regional Laboratory Council of Scientific and Industrial Research. 1982 p. 603-606.

Karkowska-Kuleta J, Rapala-Kozik M, Kozik A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Bioch Polonica* 2009; 56: 211-224.

Kauffman CA, Carver PL. Antifungal agents in the 1990s Current status and future developments. *Drugs.* 1997; 53: 539-49.

Kauffman, CA; Mar KA Thoner AR .Treatment of candidemia and invasive candidiasis in adults This topic last updated: 2015, Mar 24

Khan MSA, Ahmad I. Biofilm inhibition by *Cymbopogon citratus* and *Syzygium aromaticum* essential oils in the strains of *Candida albicans*. *Journal of ethnopharmacology.* 2012; 140 (2): 416– 423.

Kirui JK, Ngure R, Bii C, Karimi PN, Mutai C, Amugune BK. Combined Antibacterial and Antifungal Activities of *Eucalyptus citriodora* and *Syzygium aromaticum*. *Essential Oils African J Pharmacol.* 2014; 3 (1): 29-37.

Klaric MS, Kosalec I, Mastelic J, Pieckova E, Pepeljnak S. Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from amp dwellings. *The Society for Applied Microbiology.* 2007; 44: 36–42.

Knoblock K, Pauli A, Iberl N *et al.* Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *J Essent Oil Res.* 1989; 1: 119-28.

Kouidhi B, Zmantar T, Bakhrouf A. Anticariogenic and cytotoxic activity of clove essential oil (*Eugenia caryophyllata*) against a large number of oral pathogens. *Ann Microbiol.* 2010; 60: 599 - 604.

Kreger-van Rij NJW. *The Yeasts — a Taxonomic Study.* 3^o ed. Amsterdam : Elsevier Science Publishers; 1984.

Kumar G, Kumar SJ, Menon T. Phospholipase and proteinase activities of clinical isolates of *Candida* from immunocompromised patients. *Mycopathologia.* 2006; 161: 213-8.

Kurtzman C, Fell JW. *The Yeasts - A Taxonomic Study.* 4^o ed. New York: Elsevier; 2013.

Lacaz CS. *Tratado de micologia médica Lacaz.* 9^a ed. São Paulo: Sarvier; 2002.

Lambert RJW, Skandamis PN, Coote P, Nychas GJE. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol.* 2001; 91: 453–462.

Larcher W. *Ecologia vegetal,* São Carlos: RiMa Artes e Textos, 2000. p.33-40.

Lee BH, Annis PC, Tumaalii F, Choil WS. Fumigant toxicity of essential oils from the *Myrtaceae* family and 1,8-cineole against 3 major stored-grain insects. *Journal of Stored Products Research.* 2004; 40: 553–564.

Lee JH, Byung KL, Jong HK, Sang HL, Soon KH. Comparison of Chemical Compositions and Antimicrobial Activities of Essential Oils from Three *Conifer Trees*; *Pinus densiflora*, *Cryptomeria japonica*, and *Chamaecyparis obtusa*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2009; 19(4), 391 – 396.

Lemos, JA. *Propriedades antifúngicas de Ocimum gratissimum sobre Cryptococcus neoformans, Histoplasma capsulatum e Paracoccidioides brasiliensis.* [Dissertação]. Goiás: Universidade Federal de Goiás; 2004.

Leonardo MR *et al.* *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of a castor oil-based irrigant. J Endod. 2001; 27 (12): 717-9.

Li Y, Xu C, Zhang Q, Liu J, Tan R. *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* action of 30 Chinese herbal medicines used to treat ulcer diseases. J Ethnopharmacol. 2005; 98 (3): 329-33.

Lima IO, Oliveira RAG, Lima EO, Farias NMP, Souza EL. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. Rev Bras Farmacogn. 2006; 16: 197-201.

Lixandru, B.E. Antimicrobial activity of plant essential oils against bacterial and fungal species involved in food poisoning an/or food decay. Romanian Archives of Microbiology and Immunology, v.69, n.4, p.224-30, 2010.

MacDonald, F, Odds FC. Virulence for mice of a proteinase-secreting strain of *Candida albicans* and a proteinase-deficient mutant. J Gen Microbiol. 1983; 129 (2): 431-38.

Macedo DPC. Infecções oportunistas por leveduras e perfil enzimático dos agentes etiológicos. Rev. Soc Bras Med Trop. 2009; 42 (2): 188-191.

Martins ER, Castro DM, Castellani DC, Dias JE. Plantas medicinais. Viçosa: Imprensa Universitária. 1995, 220p.

Magalhães DV. Atividade antifúngica de derivados sintéticos do eugenol e timol frente a cepas de *Candida* spp. e *Microsporium canis*. [dissertação]. Fortaleza: Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará; 2009.

Marzoug HN, Romdhane M, Lebrihi A, Mathieu F, Couderc F, Abderraba M, et al. *Eucalyptus oleosa* essential oils: chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of the oils from different plant parts (stems, leaves, flowers and fruits). Molecules. 2011; 16(2): 1695 - 709.

Mathur S, Udgire M, Khambhupati A, Paul D. Anti-biofilm activity and bioactive component analysis of *eucalyptus* oil against urinary tract pathogen. Int J Curr Microbiol App Sci. 2014; 3 (5): 912-918.

Mariutti, L.R.B.; Bragagnolo, N. Revisão: antioxidantes naturais da família Lamiaceae. Aplicação em produtos alimentícios. Brazilian Journal Food Technology, 2007; v.10, n.2, p.96-103.

Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. Virulence. 2013; 4 (2): 119–128.

Mendes FQ, Guerra FOPS, Souza JP, Trajano VN, Lima EO. Actividad antifúngica del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* sobre cepas de *Candida tropicalis* de aislados clínicos. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 2012; 11 (3): 208 – 217.

Menezes EA, Monteiro MNR, Parente TM *et al.* Freqüência e atividade enzimática de *Candida albicans* isolado da cavidade oral de pacientes HIV positivos em Fortaleza, Ceará. J Brás Patol Méd Lab. 2006; 42: 253-256.

Minami M, *et al.* The inhibitory effect of essential oils on Herpes simplex virus type-1 replication *in vitro*. Microbiol Immunol. 2003; 47: 681-4.

Mohan V, Ballal M. Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. Rev Iberoam Micol. 2008; 25: 208-10.

Molero G, Díez-Orejas R, Navarro-García F *et al.* *Candida albicans*: genetics, dimorphism and pathogenicity. Internatl Microbiol. 1998; 1: 95-106.

Mondello F, De Bernardis F, Girolamo A, Salvatore G, Cassone, A. *In vitro* and *in vivo* activity of tea tree oil against azole-susceptible and resistant human pathogenic yeasts. J Antimicrob Chemother. 2003; 51: 1223-1229.

Moreira, D. Candidíase vulvovaginal: abordagem dos aspectos epidemiológicos, fatores predisponentes, fatores de virulência e sensibilidade aos antifúngicos. [Dissertação]. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2005.

Mulyaningsih. S, Sporer F, Zimmermann S, Reichling J, Wink M. Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. *Phytomedicine*. 2010; 17: 1061–1066.

Murtagh JG. Biomass and oil production of tea tree. In: Tea tree: the genus *Melaleuca*. 9º ed. Amsterdam: Harwood Academic Publishers; 1999. p 109-133.

Murtagh JG, Smith GR. Month of harvest and yield components of tea tree. *Australian Journal of Agricultural & Resource Economics*. 1996; 47: 817-827.

Naglik JR, Rodgers CS, Shirlaw PJ, Dobbie JL, Fernandes-Naglick LL, Greenspan D, Agabian N, Challacombe SJ. Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in Humans correlates with active oral and vaginal infections. *J. Infect. Dis*. 2003;188: 469-479 (a).

Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secretes aspartyl proteases in virulence and pathogenesis. *Microbiol.Mol.Biol.Rev*. 2003;67:400-428 (b).

Nascimento PFC. Antimicrobial activity of the essential oils: a multifactor approach of the methods. *Rev bras farmacogn*. 2007; 17 (1): 108-113.

Nassis CZ *et al*. Atividade antibiótica de extratos de espécies de *Annonaceae*. *Cienc Cult*. 1989; 41: 527-532.

Navarro V *et al*. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. *Journal of Ethnopharmacology*. 1996; 53 (3): 143-147.

Navarro MC, Noguera MA, Romero MC, Montill AMP, Selgas JMG, Valero A. *Anisakis simplex* s.l.: Larvicidal activity of various monoterpenic derivatives of natural origin against L3 larvae *in vitro* and *in vivo* . Experimental Parasitology. 2008; 120: 295-299.

Navas EAFA *et al.* Efeitos do chá de tomilho sobre a aderência de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*. Braz Oral Res. 2006; 20: 167.

Netea MG *et al.* An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. Nat Rev Microbiol. 2008; 6: 67-78.

Nenoff P, Haustein UF, Brandt W. Antifungal activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) against pathogenic fungi *in vitro*. Skin Pharmacol. 1996; 9 (6): 388-94.

Niimi M, Firth NA, Cannon RD. Antifungal drug resistance of oral fungi. Odontology. 2010; 98: 15–25.

Nguefack AJ, Tamguea O, Dongmoa JBL, Dakolea CD, Lethb V, Vismerec HF, Zolloa PHA, Nkengfackd, AE. Synergistic action between fractions of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against *Penicillium expansum*. Food Control. 2012; 23 (2) 377-383.

Nostro A, Blanco AR, Cannatelli MA, Enea V, Flamini G, Morelli I, Roccaro AS, Alonzo V. Susceptibility of methicillin-resistant *staphylococci* to oregano essential oil, carvacrol and thymol. FEMS Microbiol. 2004; 230: 191-195.

Noumi E, Snoussi M, Bakhrouf A. *In vitro* effect of *Melaleuca alternifolia* and *Eucalyptus globulus* essential oils on mycelial formation by oral *Candida albicans* strains. Afr J Microbiol. 2010; 4 (12): 1332-1336.

Nzeako BC, Lawati BA. Comparative studies of antimycotic potential of thyme and clove oil extracts with antifungal antibiotics on *Candida albicans*. Afr J Biotechnol. 2008; 7: 1612 - 1619.

Odds FC. Pathogenesis of *Candida* infection. J American Academic Dermatol. 1994; 31 2-5.

Oliveira ACP *et al.* Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006; 101 (5): 493-497.

Oliveira GF. Avaliação da atividade antimicrobiana, *in vitro*, do extrato hidroalcoólico bruto das folhas de *Syzygium cumini* (L.) SKEELS (Jambalão). [dissertação]. São Paulo: Universidade de Franca; 2005.

Oliveira LE. Atividade do extrato de própolis verde sobre o comportamento morfológico de *Candida albicans* isoladas da mucosa bucal de pacientes HIV positivo e de pacientes com sorologia desconhecida para o HIV. [dissertação]. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças – Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; 2007.

Oliveira RAG, Lima EO, Souza EL, Vieira WL, Freire KRL, Trajano VN *et al.* Interference of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng essential oil on the anti-*Candida* activity of some clinically used antifungals. Rev Bras Farmacogn. 2007; 17 (2): 186-190.

Oliveira Y. Micropropagação de *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel. [dissertação] Curitiba: Universidade federal do Paraná; 2009.

Oliveira FM, Severo CB, Guazelli LS, Severo LC. *Cryptococcus gattii* fungemia: report of a case with lung and brain lesions mimicking radiological features of malignancy. Rev Inst Med Trop. São Paulo, 2007; 49: 263 – 5. In: Zatz C *et al.* Compêndio de Micologia Médica. 2ª Ed. Ed. Guanabar Koogan, Rio de Janeiro, 2010.

Omran MS, Esmailzadeh S, Rahmani Z. Laboratory study of anticandidal activity of thyme, pennyroyal and lemon essential oils by micro dilution method, Jundishapur J Microbiol. 2010; 3 (4): 161-7.

Ombrella AM, Racca L, Ramos L. Actividades proteínasa y fosfolipasa de aislamientos de *Candida albicans* provenientes de secreciones vaginales con distintos valores de pH. Rev Iberoam Micol. 2008; 25: 12-6.

Orsonio JS, Dora ECL, Ponce LA. Epidemiology of Invasive Fungal Infections in Latin America. Curr Fungal Infect Rep. 2012; 6: 23–34.

Ostrosky, Elissa A. et al . Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. Rev. bras. farmacogn. 2009; 18(2): 301-307.

Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O 157: H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. Food Control. 2007; 18 (5): 414-20.

Oxman DA, Chow JK, Frenzl G, et al. Candidaemia associated with decreased in vitro fluconazole susceptibility: is Candida speciation predictive of the susceptibility pattern? J Antimicrob Chemother 2010; 65:1460.

Pereira RS *et al.* Atividade bacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. Rev Saúde Pública. 2004; 38 (2): 326-8.

Pereira, C.A.M.; Maia, J.F. Estudo da atividade antioxidante do extrato e do óleo essencial obtidos das folhas de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.). Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.27, n.3, p.624-32, 2007.

Phongpaichai, S. Mackenzie, D.W.R. Fraser, C. Strain differentiation of *Candida albicans* by morphotyping. Epidemiol. Infect. 1987; 99: 421-428.

Pires MFC, Birman EG, Costa CR, Gambale W, Paula CR. *Candida albicans* biotypes isolated from the oral cavity of HIV-positive patients. Rev. Microbiol. 1996; 27:46-51.

Pires MFC, Correa B, Gambale W, Paula CR. Experimental model of *Candida albicans* (serotypes a and b) adherence in vitro. Brazilian Journal of Microbiology. 2001; 32: 163-169.

Pessini GL *et al.* Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. Rev Bras Farmacogn. 2003; 13(1): 21-24.

Pina-Vaz C, Rodrigues AG, Pinto E, Costa-de-Oliveira S, Tavares C, Salgueiro LR, Cavaleiro C, Gonçalves MJ, Martinez-de-Oliveira J. Antifungal activity of Thymus oils and their major compounds. J Eur Acad Dermatol. 2004; 18: 73–78.

Pinto E, Pina-Vaz C, Salgueiro L, Gonçalves MJ, Oliveira SC, Cavaleiro C, Palmeira A, Rodrigues A, Oliveira JM Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. Journal of Medical Microbiology. 2006; 55: 1367–1373

Prashar A. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. Phytochemistry. 2003; 63: 569-575.

Price S. Aromaterapia para doenças comuns. 1ª Ed. São Paulo: Editora Manoeli Ltda. 1999; p 50–51.

Polachini CO. Avaliação *in vitro* de extratos de plantas e produtos diversos, frente a amostras de *Candida albicans*. [dissertação]. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças – Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; 2004.

Portela MB. Estudo de proteínas funcionais de *Candida* spp. isoladas da cavidade bucal de crianças infectadas pelo Vírus da Imunodeficiência Humana. Tese [doutorado]. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2006.

Porter NG, Wilkins AL. Chemical, physical and antimicrobial properties of essential oils of *Leptospermum scoparium* and *Kunzea ericoides*. Phytochemistry, 50, 407-415. 1999.

Pozzatti, P. Comparison of the susceptibilities of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to essential oils. *Mycoses*. 2010; 53 (1): 12-5.

Pugh D, Cawson RA. The cytochemical localization of phospholipase A and lysophospholipase in *C. albicans*. *Sabouraudia*. 1975; 13: 110-115.

Pupulin AR. Susceptibilidade a antifúngicos e produção de enzimas por leveduras do gênero *Candida* isoladas de pacientes com HIV/AIDS. *Salud (i) Ciência*. 2014. 20: 471-476

Quirino MRS. Estudo clínico e microbiota fúngica da cavidade bucal de diabéticos controlados e não controlados. [dissertação]. Taubaté: Faculdade de Odontologia - Universidade de Taubaté; 1990.

Ramage G, Zalewska A, Cameron D, Sherry L, Murray C, Finnegan MB, Lowey Z, Jagger DC. A comparative *in vitro* study of two denture cleaning techniques as an effective strategy for inhibiting *Candida albicans* biofilms on denture surfaces and inducing inflammation. *J Prosthodont*. 2012.

Ramezani H, Singh HP, Batish DR, Kohli RK. Antifungal activity of the volatile oil of *Eucalyptus citriodora*. *Fitoterapia*. 2002; 73: 261-262.

Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE. *Biologia Vegetal*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2001. 906p.

Ray TL, Payne CD. Comparative production and rapid purification of *Candida* acid proteinase from protein-supplemented cultures. *Infect Immun*. 1990; 58 (2): 508-14.

Recio MC, Rios JL, Villar A. A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature 1978-1988. *Phytother Res*. 1989; 3: 117-125.

Rex JH, Sobel JD. Prophylactic antifungal therapy in the intensive care unit. *Clinical Infectious Diseases*. 2001; 32: 1191-1200.

Ribeiro EL *et al.* Detecção de *C. albicans* fosfolipidolíticas isoladas da saliva de crianças com síndrome de Down. *Acta Méd Portuguesa*. 2002; 15 (3): 171-174.

Ribeiro MA. Exoenzimas e mecanismos moleculares de resistência fluconazol de *C. albicans* isoladas de mulheres HIV positivas. [Dissertação]. São Paulo: ICB-USP; 2002.

Rocha MEN., Santos CLO. Uso comercial e popular do eucalipto *Eucalyptus globulus* Labill – Myrtaceae. *Saúde & Ambiente em Revista*. 2007; 2 (2): 23–34.

Rodrigues VM. Determinação da solubilidade em sistemas ternários: cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllus*) + CO₂, gengibre (*Zingiber officinale*) + CO₂ e erva-doce (*Pimpinella anisum*) + CO₂. Campinas: Universidade de Campinas; 2001.

Rahimifard, N. et al. Antifungal activity of the native essential oil of *Thymus vulgaris* on *Candida albicans*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* from Iran. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, v.2, n.2, p.343-6, 2008

Rorig KCO, Colacite JA, Maxwel A. Produção de fatores de virulência *in vitro* por espécies patogênicas do gênero *Candida*. *Rev Soc Bras Med Trop*. Apr. 2009; 42 (2): 225-227.

Ruchel R *et al.* A comparison of secretory proteinases from different strains of *C. albicans*. *Sabouraudia*. 1982; 20: 233-244.

Ruiz LS, Sugizaki MF, Montelli AC, Matsumoto FE, Pires MFC, Silva D, Silva EH, Gambale W, Goncalves SE, Auler ME, Paula CR. Fungemia by yeast in Brasil: occurrence and phenotypic study of strains isolated at the Public Hospital, Botucatu, São Paulo. *J Mycol Med*. 2005; 15: 13-21.

Salari MH *et al.* Antibacterial effects of *Eucalyptus globulus* leaf extract on pathogenic bacteria isolated from specimens of patients with respiratory tract disorders. *Clinical Microbiology and Infection*. 2006; 12 (2): 194-196.

Salgueiro LR, Pinto E, Gonçalves MJ. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Thymbra capitata*. *Planta Med.* 2004; 70: 572–575.

Sallé JL. O Totum em Fitoterapia. *Robe.* 1996; 1:13 -14.

Samaranayake LP. Oral mycoses in HIV infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1992; 73 (2): 171-80.

Santos OS. Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica de óleos essenciais sobre *Cryptococcus neoformans* [dissertação]. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças – Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo 2011.

Sartoratto, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.35, n.4, p.275-80, 2004.

Satchell AC, Saurajen A, Bell C, Barnetson RS. Treatment of dandruff with 5% tea tree oil shampoo. *J Am Acad Dermatol.* 2002; 47: 852-5.

Serafino A, Vallebona PS, Andreola F *et al.* Stimulatory effect of *Eucalyptus* essential oil on innate cell-mediated immune response. *BMC Immunol.* 2008; 9: 17.

Shabnum S, Wagay MG. Essential oil composition of *Thymus vulgaris* L. and their uses. *J Res Dev.* 2011; 11: 83–94.

Shareck J, Belhumeur P. Modulation of Morphogenesis in *Candida albicans* by Various Small Molecules. *Eukariotic Cell.* 2011; 10 (8): 1004–1012.

Sidrim JJC, Rocha MFG. Candidíase. In: *Micologia médica à luz de autores contemporâneos.* Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 2004; p 265-274.

Silva AF, Barbosa LCA, Silva EAM, Casali VWD, Nascimento EA. Composição química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae). *Revista Brasileira de Plantas Medicinai.* 2003; 6: 1-7.

Silva JPL, Duarte-Almeida JM, Perez DV, Franco BDGM. Óleo essencial de orégano: interferência da composição na atividade frente a *Samonella Enteritidis*. *Ciência e Tecnol Aliment*. 2010; 30 (1): 136-141.

Silva RC. Comportamento morfológico de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*: sensibilidade a antifúngicos e ao extrato etanólico de própolis. [dssertação]. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças – Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; 2007.

Silva MRO. Detecção da atividade antifúngica de extratos de plantas do manguezal de Vila Velha, Itamaracá-PE. [dissertação]. Pernambuco: Universidade Federal de Pernambuco; 2004.

Silva, SRS; Demuner, AJ; Barbosa, LCA; Casali, VWDC; Nascimento, EAN; Pinheiro, AL. Efeito do estresse hídrico sobre características de crescimento e a produção de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. *Acta Scientiarium*, 2002; 24(5): 1363 – 1368.

Silva CB *et al*. Antifungal activity of the lemongrass oil and citral against *Candida* spp. *Braz J Infect Dis*. 2008 12 (1): 63-66.

Silveira FRX *et al*. Proteinase and phospholipase activity of *C. albicans* isolated from oral mucosa of healthy carriers (smokers and non smokers). *Rev Iber Micol*. 1993; 10: 105-108.

Simões JLP, Amaral ACF, Ferreira EV. Coletânea científica de plantas de uso medicinal. Rio de Janeiro: FIOCRUZ.; 2005.

Simões MO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. da UFSC; 1999.

Siqueira JJ. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;94(3):281-293.

Skrobonja JR, Delić DN, Karaman MA, Matavulj MN, Bogavac MA. Antifungal properties of *Foeniculum vulgare*, *Carum carvi* e *Eucalyptus* sp essential oils against *Candida albicans* strains. *Jour Nat Sci.* 2013; 124: 195—202.

Sousa, M. O., Matos, M. E. O, Matos, F. J. A., Machado, M. I. L, Craveiro, A. A. *Constituintes Químicos Ativos em Plantas Medicinais Brasileiras.* Ed. Univer Fed Ceará, 1991.

Souza CMM, Silva HR, Vieira Jr GM, Ayres MCC, Costa CLS, Araújo DS et al., Fenóis totais e atividade antioxidadente de cinco plantas medicinais. *Quím Noca.* 2007; v. 30, n. 2, 351-355.

Souza JRP; Morais H; Caramori PH; Jojannsson LAPS; Miranda LV. Desenvolvimento da espinheira-santa sob diferentes intensidades luminosas e níveis de poda. *Horticultura Brasileira,* 2008,.26: 40-44.

Sousa JP, Azerêdo GA, Torres RA, Vasconcelos MAS, Conceição M L, Souza EL. Synergies of carvacrol and 1,8-cineole to inhibit bacteria associated with minimally processed vegetables. *International Journal of Food Microbiology.* 2012; 154 (3): 145-151.

Stahl-Biskup EO, Sa´ ez F. *Thyme – the Genus Thymus.* London: Taylor & Francis; 2002.

Stamopoulos DC, Damos P, Karangianidou G. Bioactivity of five monoterpenoid vapours to *Tribolium confusum* (du Val) (*Coleoptera: Tenebrionidae*). *Journal of stored Products Research.* 2007; 43: 571-577.

Stewart K *et al.* The secreted proteinases from *Candida albicans*: challenges for structure-aided drug design. In: DUNN, B. M. *Proteinases of infections agents.* San Diego: Academic Press; 1999. p 117-38.

Sudbery PE. Growth of *Candida albicans* hyphae. Nat Rev Microbiol. 2011; 9: 737-48, PMI.

Suresh B, Sriram S, Dhanara, SA. Anticandidal activity of *Santolina chamaecyparissus* volatile oil. J Ethnopharmacol. 1997; 55: 151-9.

Sweet SP. Selection and pathogenicity of *Candida albicans* in HIV infection. Oral Dis. 1997; 3 (1): S88-S95.

Takahashi T, Kokubo R, Sakaino M. Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculata*. Letters in Applied Microbiology. 2004; 39 (1): 60-64.

Terzi V, Morcia C, Faccioli P, Vale G, Tacconi G, Malnati M. *In vitro* antifungal activity of the tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oil and its major components against plant pathogens. Letters in Applied Microbiology. 2007; 44: 613–618.

Toledo VS. avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel sobre *Candida albicans*, no interior do canal radicular *in vitro* e como medicação intracanal [dissertação]. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças – Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo 2013.

Torres CR, Kubo CH, Anido AA, Rodrigues JR. Agentes antimicrobianos e seu potencial de uso na odontologia. Ver Fac Odontol. 2000; 3 (2): 43-52.

Tripathi AK, Prajapati V, Aggarwal KK, Kumar S. Toxicity, Feeding Deterrence, and Effect of Activity of 1,8-Cineole from *Artemisia annua* on Progeny Production of *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). Journal of Economic Entomology. 2001; 94: 979-983.

Vale-Silva, L.A. et al. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus viciousi* against *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and dermatophyte species. Planta Medica, v.76, n.9, p.882-8, 2010.

Valverde JM, Guillén F, Bailén G, Zapata P, Castillo S, Serrano M, Martínez - Romero D, Valero D. Diseño de un envase activo para mantener la calidad y seguridad de uva de mesa. In: VIII Simposio Nacional y V Ibérico de Maduración y Post-recolección, Orihuela (Alicante). Espanha, Setembro; 2006.

Van Vuuren S, Viljoen A. Plant-based antimicrobial studies—methods and approaches to study the interaction between natural products. *Planta Med.* 2011; 77: 1168–1182.

Venskutonis PR. Effect of drying on the volatile constituents of thyme (*Thymus vulgaris* L.) And sage (*Salvia officinalis* L.). *Food Chemistry.* 1997; 59 (2): 219-277.

Venskutonis PR., Poll L, Larsen M. Influence of Drying and Irradiation on the Composition of Volatile Compounds of Thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Flavour and Fragrance Journal.* 1996; 11: 123 – 128.

Verpoorte R; Maraschin M. Engenharia do Metabolismo de Plantas Mediciniais. In: Yunes RA; Calixto, JB. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Campus Chapecó, Santa Catarina: Argos- Ed. Universitária UNOESC, 2001. p. 381-432.

Vidotto V, Sinicco A, Di Faria D, Cardaropoli S, Aok S, Ito-Kuwa S. Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia* 136: 119-123, 1996.

Vila R, Cañigueral S. El aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* em el tratamiento de La vulvovaginitis. *Rev de Fitoterapia.* 2006; 6 (2): 119-128.

Viollon C, Chaumont JP. Antifungal properties of essential oils and their main components upon *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia.* 1994; 128: 151-153.

Vitti AS, Brito JO. Óleo Essencial de Eucalipto. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz; 2003.

Wannissorn B *et al.* Properties of essential oils from Thain medicinal plants. *Fitoterapia.* 2005; 76: 233-6.

Weckesser S *et al.* Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. *Phytomedicine*. 2007; 14 (7-8): 508-16.

Williams DW, Kuriyama T, Silva S, Malic S, Lewis MA. *Candida* biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. *Periodontol*. 2011; 55: 250–265.

Wingeter MA, Guilhermetti E, Shinobu CS. Microbiological identification and *in vitro* sensitivity of *Candida* isolates from the oral cavity of HIV-positive individuals. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007; 40: 272-276.

Yin, Q. et al. Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of carvacrol on human hepatocellular carcinoma cell line HepG-2. *Cytotechnology*, v.64, n.1, p.43-51, 2012.

Zeichner LO, Pappas PG. Invasive candidiasis in the intensive care unit. *Journal of Critical Care Medicine*. 2006; 34: 857-863.

Zonios DI, Bennett JE. Update on azole antifungals. *Semin Respir Crit Care Med* 2008; 29:198.

Zoghbi MGB, Andrade EHA, Maia JGS. Aroma de flores na Amazônia. Série Adolpho Ducke. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi; 2001.

Živković R, Mirjana P, Valentina AA, Martinovic Ž, Pekmezovic M, Stojic Ž, Raickovic V, Đurisić S. Susceptibility profile of *Candida* spp. isolated from humans and dogs with stomatitis to the essential oil of *Thimus vulgaris*. *Acta Veterinaria*. 2013; 63 (5-6): 707-715.

Zuzarte M, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Canhot J, Vale-Silva L, Silva MJ, Pinto E, Salgueiro L. Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Lavandula viridis* L'Hér. *J Med Microbiol*. 2011; 60:612-618.

8. ANEXOS

ANEXO 1: Aprovação do Comitê de Ética do Instituto Adolfo Lutz



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
Comitê de Ética em Pesquisa - CEPAL
Av. Dr. Arnaldo, 355 - Sala 88 - Cerqueira César - 01246-902
Fone: 3063-2859 e-mail: cepal@idolanscm.br



São Paulo, 25 de outubro de 2010.

Protocolo: 084/2010

Projeto de Pesquisa: "Atividade de óleos essenciais sobre *Candida albicans*"

Pesquisador Responsável: Maria de Fátima Costa Pires

Instituição: Instituto Adolfo Lutz

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz - CEPAL analisou e deliberou, em reunião de 21 de outubro de 2010, que para o referido projeto **NÃO SE APLICA** a apreciação de acordo com a Resolução CNS 196/96 - que aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. O CEPAL considerou o protocolo de pesquisa descrito e documentado com rigor científico.

Luz Marina Trujillo
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
Instituto Adolfo Lutz - CEPAL

P. da - coordenador
P. da - CEPAL
LMT/brpp

ANEXO 2:

Ficha de identificação de leveduras

Seção de Micologia do Departamento de Microbiologia do ICB-USP

Procedência: _____ Registro: _____

Observações: _____

1 Exame direto: _____

2 Crescimento em meios especiais _____

Crescimento em meio de ácido graxos _____

3 Microcultivo e tubo germinativo _____

PM () BL () AR () TG () MV () CL () Outras _____

PM-pseudomicélio; BL-blastoconídio; AR-artrósporos, TG: tubo germinativo, MV-micélio verdadeiro; CL-clamidoconídio;

4 Ascos e ascósporos _____

Positivo _____ Negativo _____ Forma _____ Nº _____ localização _____

5 Outras provas:

Síntese de amido _____ Prod. Melanina _____ TTC _____

6 Auxanograma:

KNO₃ () Glicose () Inositol () Sacarose () Lactose () Dulcitol () Xilose ()

Rafinose () Celobiose () Melibiose () Treatose () Ramnose () Maltose ()

7 Zimograma:

Glicose () Maltose () Lactose () Sacarose ()

Diagnóstico: _____

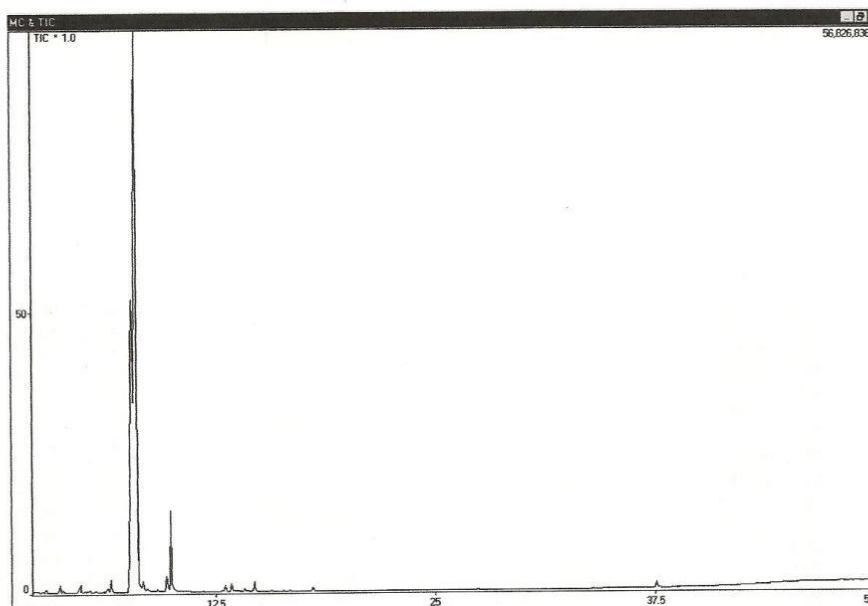
ANEXO 3: Cromatografia de Eucalyptus citriodora

Composição e quantificação relativa de óleos essenciais

Shimadzu 14B/QP5050A
 Coluna: BPX5 (non polar 5% polysilphenylene)
 Temperatura inicial: 60 °C
 Temperatura final: 280 °C
 Gradiente: 5 °C/min

Eucalyptus citriodora Lote 5750410/1

Composição	%
citronelal	93,99
β-citronelol	2,29

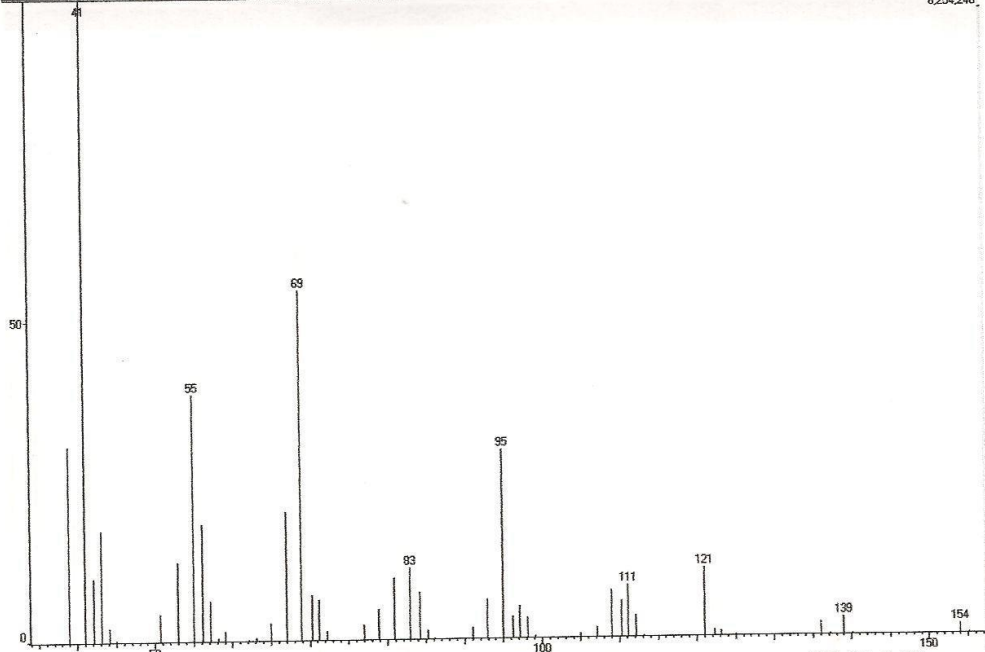


PKNO	R.TIME	I.TIME	F.TIME	A/H(sec)	AREA	HEIGHT	MARK	%Total	NAME
1	7.778	7.550	7.850	7.910	231574792	29275998		93,99	
3	8.151	8.100	8.225	2.422	15744753	6501656	V	2.29	

citronelal

Ret Time 7.775 Scan # 682

6,254,240

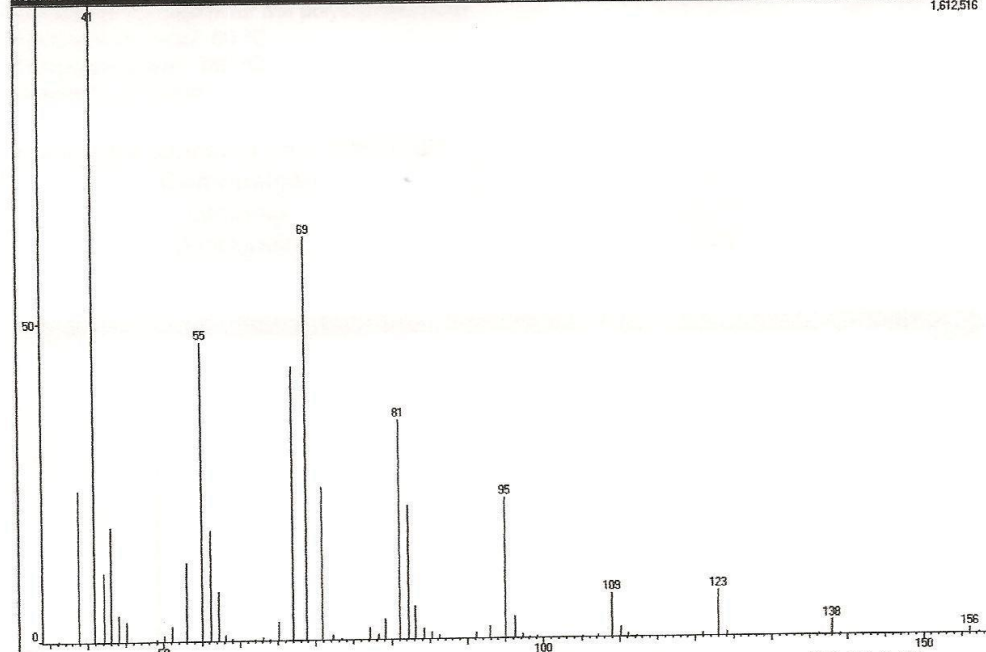


34.90	0.04	67.00	20.11	99.10	0.44	128.05	0.02
35.65	0.04	68.95	54.64	100.25	0.03	131.05	0.02
38.90	30.64	70.25	7.08	101.25	0.02	132.05	0.03
40.95	100.00	71.20	6.37	102.25	0.03	133.05	0.04
42.10	10.01	72.20	1.41	103.35	0.06	133.95	0.04
43.10	17.37	73.25	0.11	105.00	0.69	136.00	2.11
44.10	2.14	74.20	0.07	107.05	1.63	137.15	0.26
45.05	0.35	75.45	0.11	109.05	7.30	139.00	2.86
45.95	0.07	77.00	2.39	110.20	5.66	140.10	0.24
46.95	0.05	78.95	4.80	111.15	8.10	141.20	0.03
47.95	0.04	80.95	9.68	112.15	3.47	143.20	0.02
50.70	4.40	82.90	11.20	113.20	0.24	144.20	0.02
52.95	12.32	84.15	7.35	114.25	0.05	145.20	0.02
55.00	38.48	85.20	1.48	115.25	0.05	146.20	0.02
56.10	18.29	86.15	0.17	116.25	0.04	148.20	0.02
57.15	6.25	87.25	0.05	117.25	0.05	149.20	0.02
58.20	0.60	89.15	0.10	120.95	10.70	150.20	0.02
59.10	1.55	91.05	1.73	122.20	1.02	152.15	0.05
60.25	0.10	92.95	6.23	123.20	0.88	154.00	1.60
61.20	0.05	95.00	29.55	124.25	0.09	155.10	0.21
62.10	0.26	96.20	3.48	125.10	0.16	156.15	0.02
63.10	0.60	97.15	5.10	126.10	0.10		
65.00	2.87	98.15	3.33	127.05	0.03		
156.16							

β-citronelol

Ret Time 10.000 Scan # 943

1,612,516



35.00	0.10	65.15	2.98	98.10	0.16	138.00	2.36
36.15	0.27	67.05	43.07	99.20	0.40	139.15	0.29
38.90	23.83	68.85	63.42	100.20	0.13	156.05	0.79
40.90	100.00	70.80	24.12	103.20	0.12	157.35	0.16
42.10	10.82	72.25	0.84	104.20	0.10		
43.10	17.94	73.35	0.17	105.20	0.17		
44.10	4.14	74.35	0.11	106.20	0.15		
45.10	3.07	75.35	0.11	107.20	0.40		
46.45	0.11	77.05	1.95	109.05	6.94		
47.45	0.08	78.25	0.89	110.20	1.54		
48.25	0.08	79.20	3.26	111.15	0.53		
49.10	0.36	81.00	34.65	112.25	0.30		
50.10	0.92	82.15	21.07	113.25	0.15		
51.10	2.39	83.15	5.31	114.25	0.06		
53.00	12.33	84.25	1.67	115.25	0.09		
55.00	47.10	85.25	1.21	117.25	0.07		
56.15	17.43	86.25	0.63	118.25	0.09		
57.15	7.86	87.15	0.15	119.25	0.10		
58.15	1.00	89.00	0.12	120.95	0.49		
59.05	0.44	90.00	0.08	123.00	7.20		
60.00	0.09	91.15	1.02	124.15	0.69		
61.00	0.08	92.95	1.96	125.25	0.07		
62.00	0.18	95.00	22.14	128.25	0.06		
63.10	0.48	96.20	3.46	135.25	0.09		
63.95	0.30	97.20	0.67	136.25	0.16		

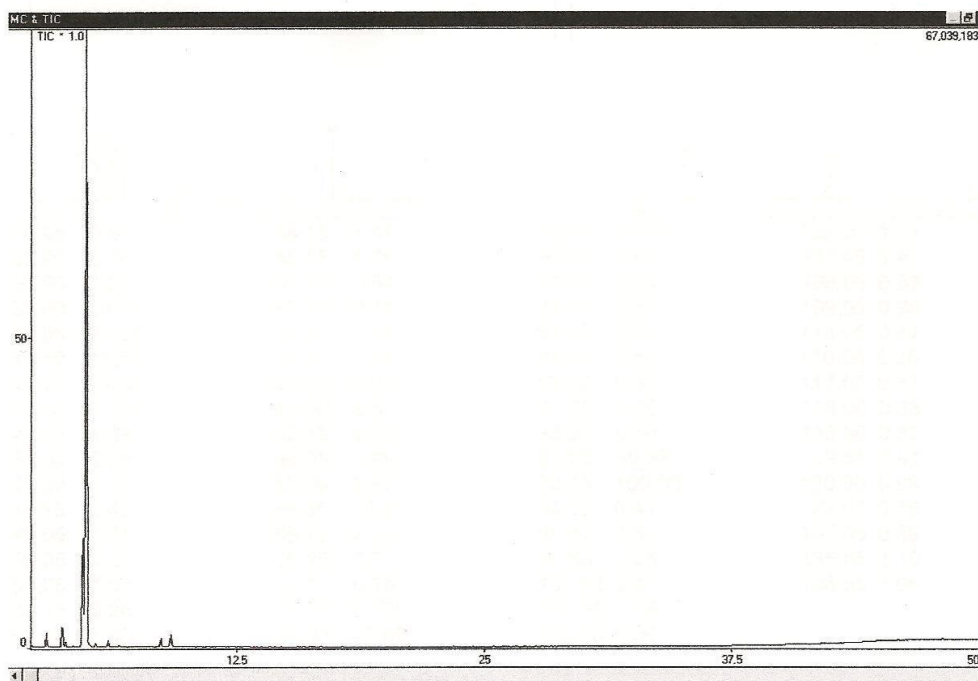
ANEXO 4: Cromatografia de *Eucalyptus globulus*

Composição e quantificação relativa de óleos essenciais

Shimadzu 14B/QP5050A
 Coluna: BPX5 (non polar 5% polysilphenylene)
 Temperatura inicial: 60 °C
 Temperatura final: 280 °C
 Gradiente: 5 °C/min

Eucalyptus globulus Lote 2700210

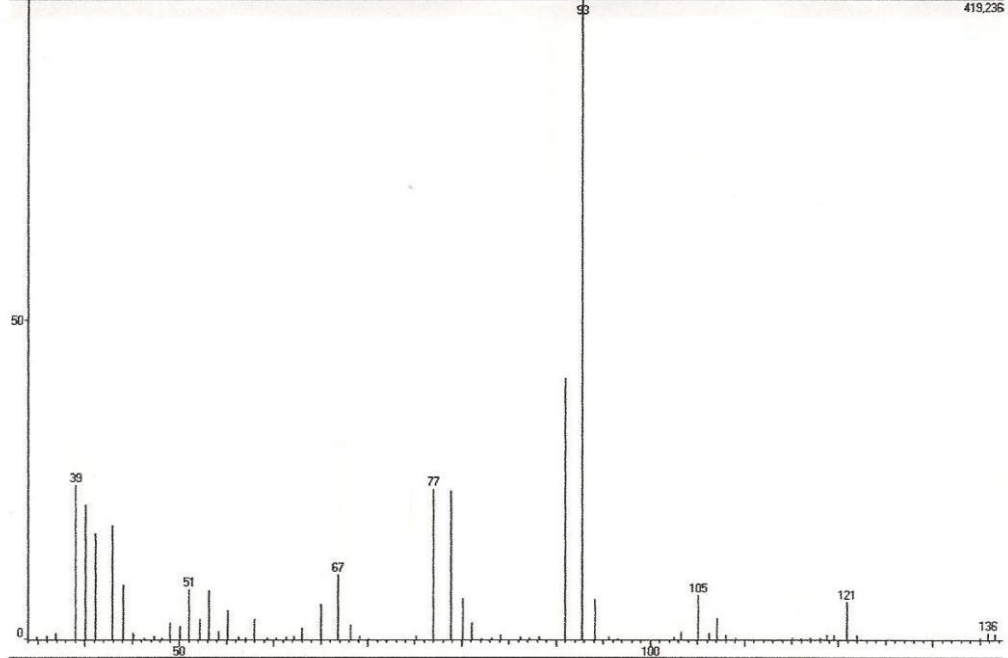
Composição	%
sabineno	1,72
β -pineno	2,58
limoneno	14,03
eucaliptol	80,50
α -terpineol	1,17



PKNO	R.TIME	I.TIME	F.TIME	A/H(sec)	AREA	HEIGHT	MARK	%Total	NAME
1	2.907	2.850	3.008	3.648	5167790	1416698		1.72	
2	3.697	3.633	3.800	3.786	7759914	2049404		2.58	
3	4.744	4.633	4.800	3.665	42146591	11501286		14.03	
4	4.923	4.800	5.025	3.634	241798335	66537726	V	80.50	
5	9.178	9.125	9.258	2.916	3506360	1202657		1.17	

SABINENO

Ret. Time: 2.917 Scan #: 39 419.236

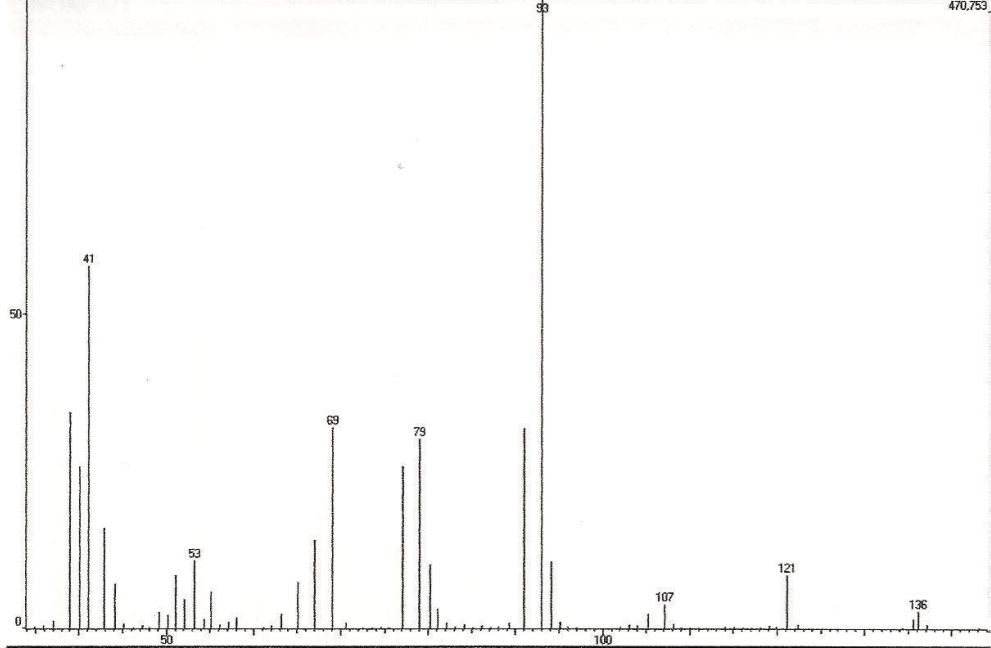


34.95	0.57	54.15	1.48	78.85	23.31	106.20	1.11
35.95	0.74	55.15	4.76	80.10	6.63	107.05	3.47
36.95	1.21	56.25	0.54	81.05	2.66	108.05	0.82
39.00	24.37	57.00	0.41	82.15	0.29	109.05	0.38
40.05	21.28	58.00	3.29	83.15	0.37	115.05	0.42
41.10	16.69	59.30	0.36	84.10	0.81	116.05	0.26
42.90	17.95	60.30	0.32	86.20	0.53	117.05	0.37
44.05	8.73	61.30	0.51	87.20	0.35	118.00	0.33
45.10	1.12	62.15	0.70	88.20	0.50	118.80	0.82
46.30	0.38	63.05	1.96	91.00	40.92	119.55	0.91
47.30	0.72	65.00	5.57	92.75	100.00	120.90	5.99
48.15	0.42	66.85	10.21	94.15	6.41	122.00	0.79
49.05	2.71	68.15	2.43	95.60	0.51	135.05	0.39
50.05	2.31	69.15	0.71	96.60	0.25	135.85	1.10
51.05	7.88	70.15	0.25	102.60	0.47	136.55	1.06
52.15	3.26	75.15	0.72	103.35	1.36		
53.10	7.80	77.00	23.69	105.10	7.06		

β-PINENO

Ret Time 3.700 Scan # 193

470.753

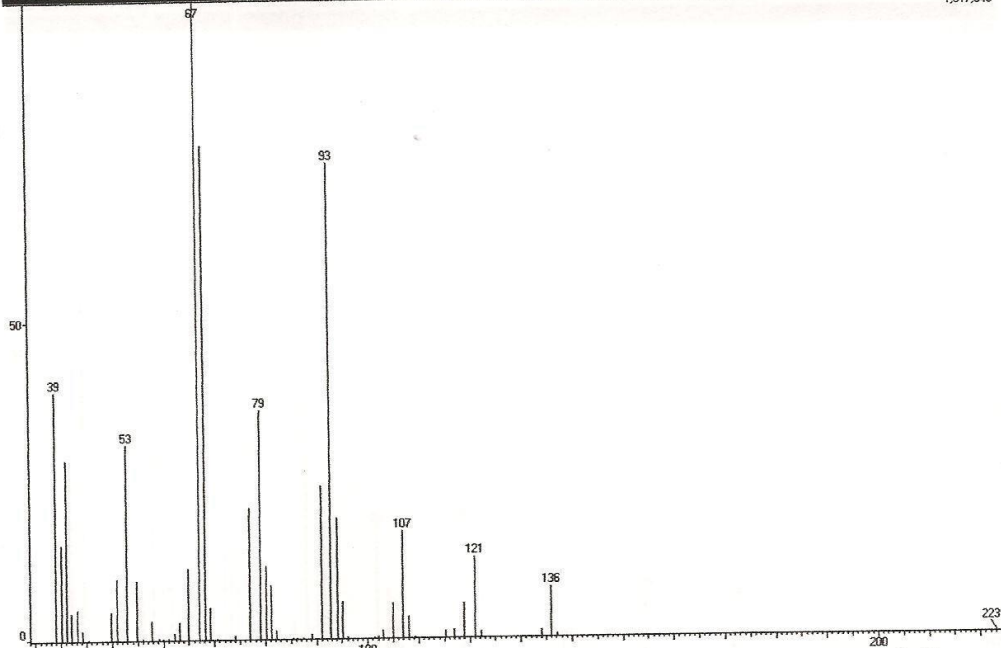


34.90	0.44	56.10	0.71	83.15	0.39	109.05	0.30
35.90	0.46	57.15	1.09	84.15	0.71	110.05	0.23
37.00	1.32	58.05	1.72	85.15	0.28	111.05	0.28
38.90	34.53	61.10	0.26	86.15	0.48	114.05	0.32
40.05	25.84	62.00	0.56	87.15	0.22	115.05	0.45
41.05	57.67	63.15	2.37	88.10	0.36	116.05	0.26
42.85	16.17	65.05	7.47	89.30	0.99	117.05	0.26
44.05	7.16	66.95	14.09	91.00	31.88	118.05	0.24
45.10	0.86	69.00	32.03	92.95	100.00	119.05	0.52
46.25	0.30	70.60	0.93	94.15	10.70	119.90	0.41
47.25	0.49	72.60	0.29	95.10	1.11	121.10	8.50
48.05	0.22	73.60	0.26	96.05	0.45	122.35	0.69
49.10	2.67	74.60	0.34	97.05	0.30	134.35	0.22
50.15	2.24	75.45	0.29	102.05	0.34	135.55	1.61
51.05	8.58	77.05	25.90	103.05	0.70	136.15	2.81
52.05	4.63	79.00	30.21	104.00	0.52	137.10	0.65
53.15	10.94	80.20	10.19	105.15	2.45	143.10	0.23
54.25	1.67	81.10	3.14	107.10	3.91		
55.10	5.95	82.15	1.04	108.10	0.89		
143.11							

LIMONENO

Ret. Time 4.750 Scan # 319

1.917348

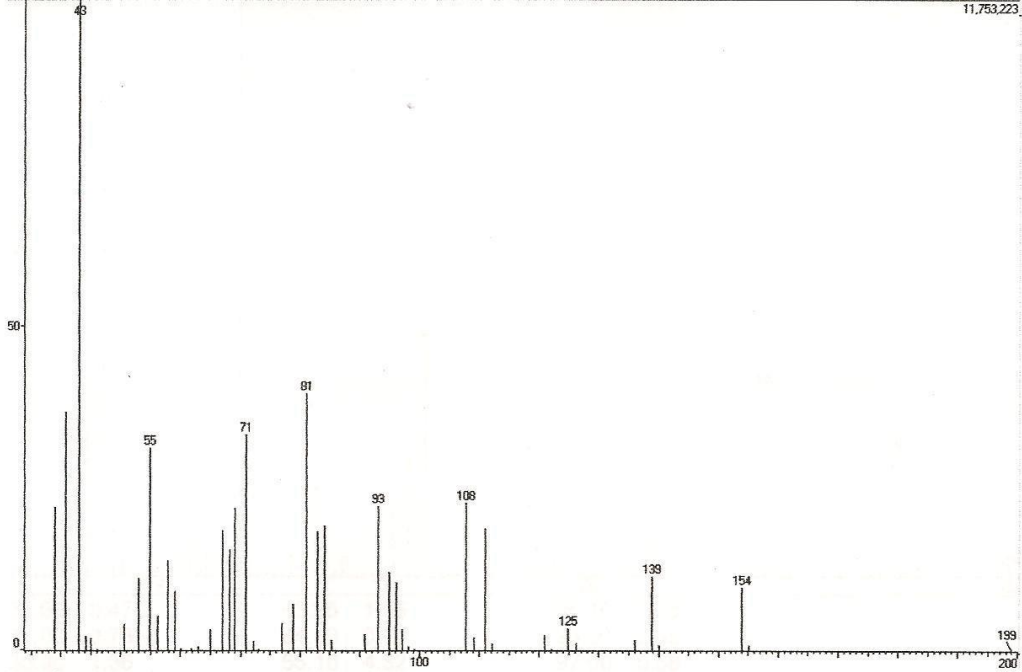


34.95	0.10	59.20	0.33	84.40	0.11	108.15	3.47
35.70	0.07	59.90	0.29	85.40	0.17	109.20	0.26
38.90	39.15	61.05	0.37	86.30	0.23	113.25	0.07
40.05	15.18	62.15	1.21	87.45	0.19	115.15	1.21
41.05	28.52	63.15	2.90	88.20	0.09	117.00	1.29
42.15	4.40	65.00	11.42	89.10	0.78	119.00	5.44
43.15	5.03	67.05	100.00	91.05	24.10	120.95	12.75
44.15	1.61	68.15	77.62	92.80	74.56	122.15	1.02
45.30	0.28	69.20	5.17	94.15	19.01	123.10	0.12
46.45	0.07	70.45	0.16	95.15	6.00	127.10	0.06
47.45	0.09	71.45	0.05	96.15	0.34	128.10	0.09
48.20	0.09	74.00	0.64	97.10	0.07	132.10	0.08
49.90	4.58	76.95	20.79	98.10	0.06	134.00	1.11
51.05	9.76	78.95	36.09	101.35	0.17	136.00	7.99
52.85	30.75	80.15	11.60	102.15	0.36	137.20	0.56
54.85	9.43	81.15	8.58	103.10	1.33	223.20	0.06
56.05	0.41	82.20	1.52	104.95	5.66		
57.85	3.17	83.55	0.12	107.00	16.97		
223.21							

EUCALIPTOL

Ret Time 4.933 Scan # 341

11.753.223

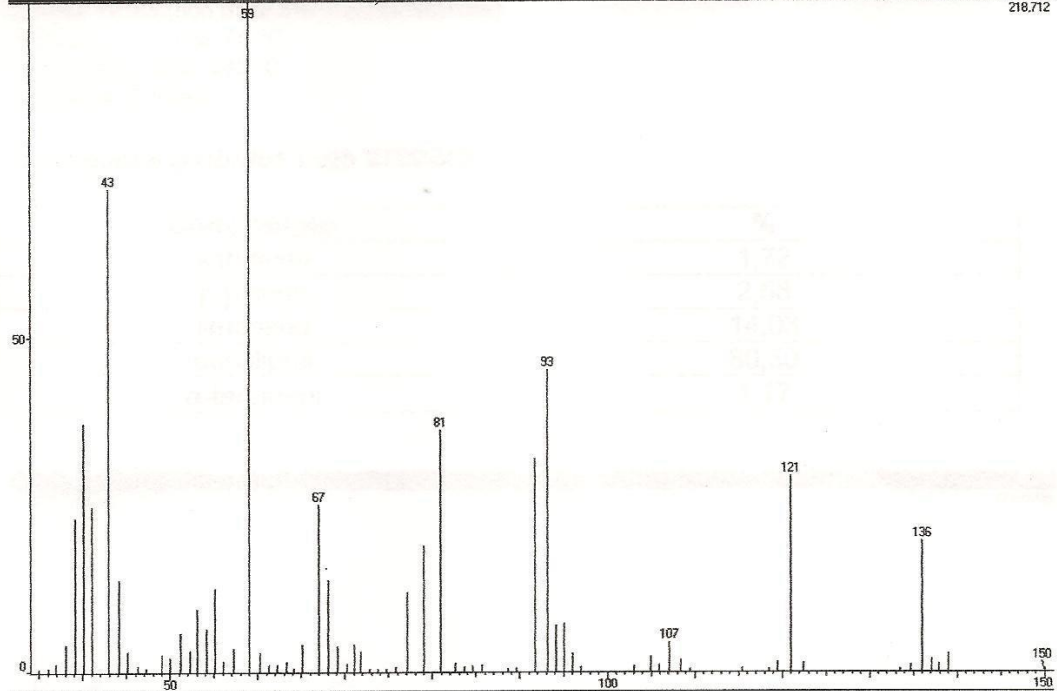


34.90	0.04	68.15	15.70	98.15	0.69	127.65	0.06
35.70	0.03	69.15	21.94	99.15	0.25	128.65	0.01
38.90	22.14	71.00	33.29	100.25	0.02	129.65	0.01
40.90	36.85	72.20	1.51	102.30	0.03	130.65	0.01
42.95	100.00	73.20	0.16	103.15	0.04	131.65	0.02
44.15	2.25	74.10	0.05	107.85	22.73	132.65	0.02
45.10	1.96	74.95	0.07	109.20	2.11	133.65	0.02
46.10	0.23	77.00	4.26	111.00	18.86	136.00	1.66
47.05	0.12	78.95	7.24	112.20	1.21	138.90	11.48
50.70	4.08	81.00	39.57	113.55	0.04	140.10	0.88
52.95	11.12	82.90	18.40	115.20	0.03	141.05	0.05
54.85	31.25	84.15	19.29	116.05	0.01	142.10	0.01
56.15	5.39	85.25	1.65	116.80	0.03	150.10	0.01
57.95	13.93	86.20	0.08	117.35	0.02	153.95	9.81
59.15	9.11	87.25	0.02	118.10	0.01	155.15	0.86
60.15	0.41	90.95	2.54	119.05	0.10	156.05	0.05
61.80	0.31	93.00	22.31	121.00	2.46	157.15	0.01
63.05	0.62	94.95	12.04	122.20	0.18	199.10	0.01
65.00	3.37	96.15	10.51	124.90	3.49		
67.00	18.56	97.20	3.25	126.15	1.15		
199.11							

α-TERPINEOL

Ret Time 9.142 Scan # 852

218.712



35.00	0.47	63.25	1.55	95.10	7.26
36.00	0.73	64.10	0.72	96.00	2.85
36.90	1.36	65.10	4.32	97.00	0.88
38.05	4.19	66.95	25.06	103.00	0.96
39.10	23.02	68.10	13.79	104.95	2.43
40.05	37.32	69.10	3.86	105.85	1.19
41.05	24.73	70.15	1.35	107.05	4.56
42.95	72.19	71.00	4.31	108.40	1.90
44.10	13.80	71.75	3.21	109.45	0.60
45.05	3.10	72.75	0.62	115.45	0.66
46.25	1.00	73.75	0.51	118.45	0.51
47.25	0.68	74.75	0.57	119.40	1.63
49.05	2.76	75.75	0.87	121.05	29.22
49.95	2.31	77.05	11.89	122.45	1.50
51.10	5.97	78.95	18.87	133.45	0.58
52.25	3.25	80.90	36.19	134.65	1.23
53.10	9.48	82.60	1.48	136.00	19.53
54.15	6.57	83.60	0.88	137.10	2.12
55.05	12.51	84.60	0.94	137.90	1.28
56.05	1.70	85.60	1.17	139.00	2.83
57.25	3.60	88.60	0.51	150.0	0.5
59.00	100.00	89.60	0.73		
60.20	3.06	91.70	31.83		
61.25	1.23	93.10	45.12		
62.25	1.22	94.15	7.03		

ANEXO 5: Cromatografia de *Eugenia caryophyllus*

Composição e quantificação relativa de óleos essenciais

Shimadzu 14B/QP5050A

Coluna: BPX5 (non polar 5% polysilphenylene)

Temperatura inicial: 60 °C

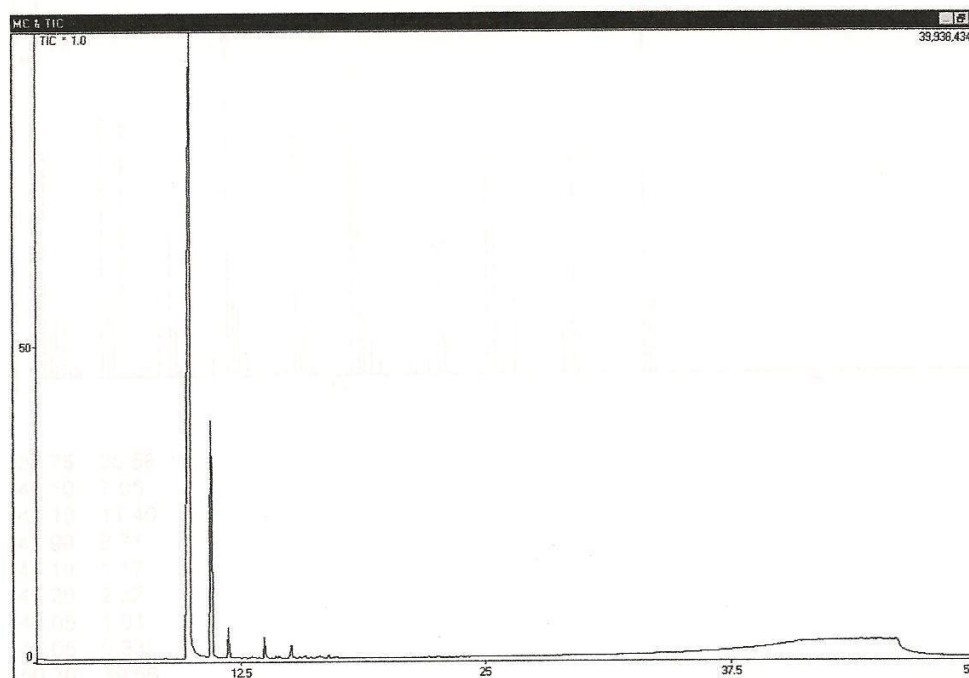
Temperatura final: 280 °C

Gradiente: 5 °C/min

FLUXO

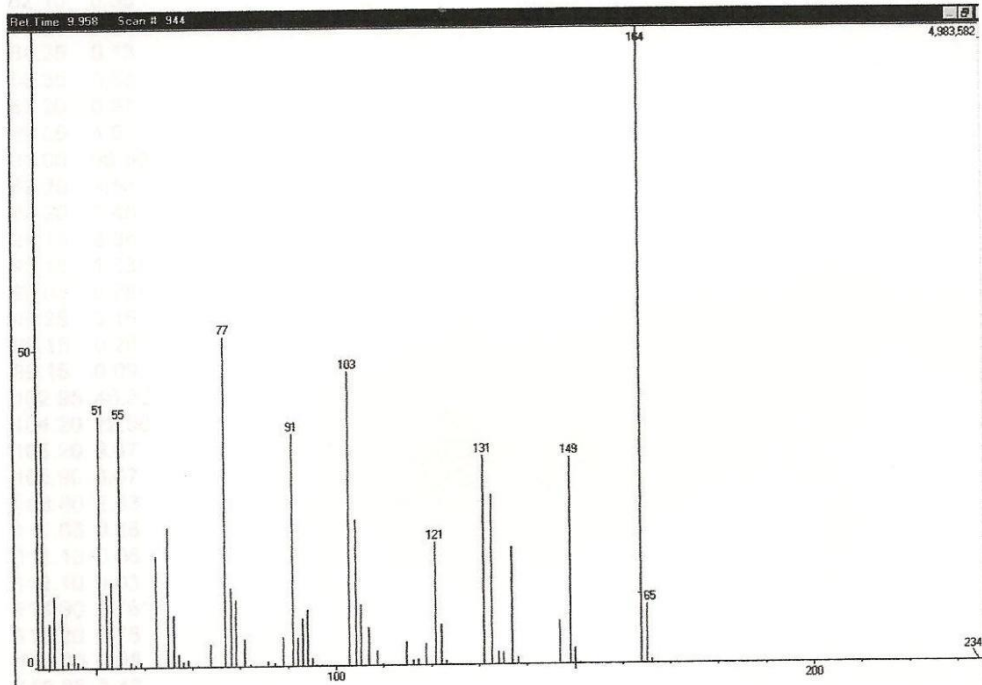
Eugenia caryophyllus Lote 4470310

Composição	%
eugenol	84,10
β -cariofileno	12,67
α -cariofileno	1,51
acetato de isoeugenol	1,08



PKNO	R.TIME	I.TIME	F.TIME	A/H(sec)	AREA	HEIGHT	MARK	%Total	NAME
1	9.977	9.683	10.150	9.038	356267447	39419470		84.10	
2	11.021	10.900	11.150	3.606	53655609	14878157		12.67	
3	11.898	11.825	12.000	3.424	6403671	1870451		1.51	
4	13.740	13.658	13.850	3.570	4573399	1280917		1.08	

EUGENOL

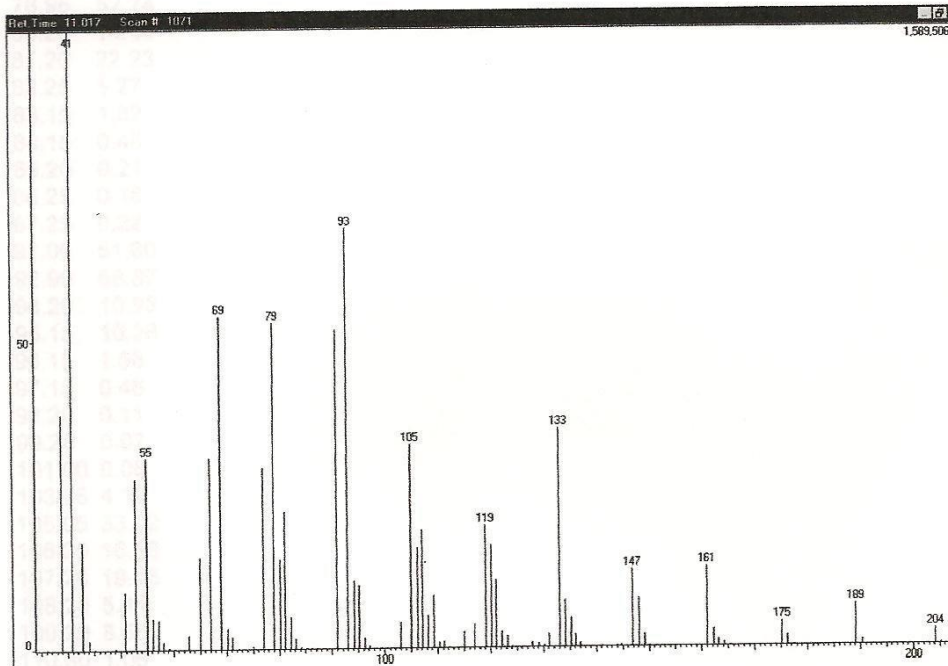


38.75	35.58
40.10	7.05
41.10	11.40
42.90	8.71
44.10	1.17
45.20	2.32
46.05	1.01
47.05	0.33
50.70	39.56
52.10	11.49
53.10	13.43
55.00	38.76
57.15	0.83
58.20	0.39
59.15	0.88
62.50	17.52
64.95	21.95

66.15	8.07
67.20	2.07
68.15	0.86
69.15	1.12
70.15	0.13
71.15	0.25
73.95	3.56
76.90	51.96
78.20	12.46
79.15	10.56
80.90	4.28
82.15	0.38
83.20	0.12
84.25	0.13
85.85	0.88
87.20	0.57
89.05	4.61
91.05	36.50
92.20	4.54
93.20	7.46
94.15	8.85
95.15	1.33
96.05	0.28
97.25	0.16
98.15	0.26
99.15	0.09
102.95	46.32
104.20	22.96
105.20	9.67
106.90	6.07
108.80	2.33
110.05	0.26
111.10	0.06
112.10	0.03
114.90	3.76
116.20	0.78
117.20	0.98
118.85	3.43
121.00	19.34
122.10	6.52
123.10	0.75
124.05	0.21
125.10	0.03
127.20	0.11
127.95	0.11
130.95	32.83
132.75	26.84
134.15	1.99
135.15	1.92
137.00	18.46
138.10	1.20
139.00	0.12
140.15	0.02
143.15	0.04
143.95	0.03
146.85	6.92

149.00	32.60
150.20	2.44
151.20	0.25
152.55	0.03
163.95	100.00
165.15	9.30
166.20	0.75
167.55	0.03
234.50	0.03

β-CARIOFILENO:



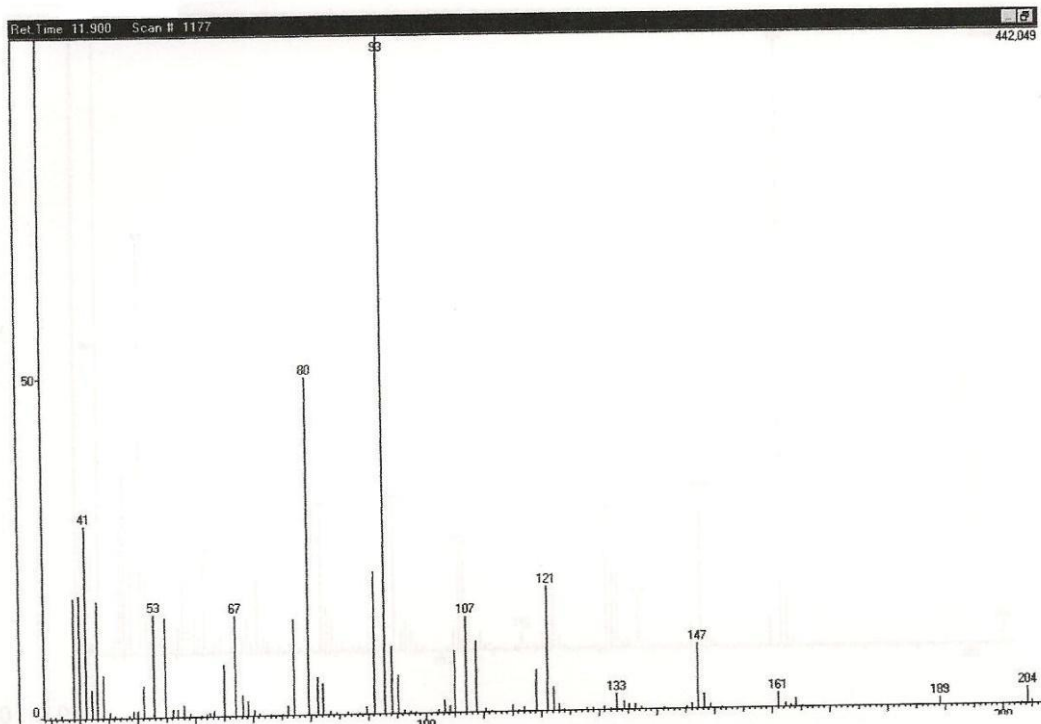
34.90	0.08
36.00	0.23
38.95	38.25
40.90	100.00
42.80	17.58
44.15	1.67
45.15	0.28
47.30	0.10
48.15	0.11
49.05	0.40
50.90	9.42
52.90	27.72
54.95	31.05
56.15	5.14
57.20	4.84
58.15	1.25

59.20	0.44
60.30	0.18
61.15	0.07
62.85	2.42
65.00	15.02
67.00	31.03
69.00	53.85
70.20	3.34
71.20	2.01
72.35	0.21
73.35	0.15
74.10	0.11
75.10	0.58
77.05	29.37
78.95	52.74
80.20	14.44
81.20	22.23
82.25	5.27
83.15	1.82
84.15	0.45
85.20	0.21
86.25	0.18
87.25	0.22
91.00	51.60
92.90	68.07
94.20	10.98
95.15	10.28
96.15	1.68
97.15	0.46
98.20	0.11
99.20	0.07
101.00	0.08
103.05	4.16
105.05	33.02
106.20	16.38
107.20	19.28
108.20	5.44
109.20	8.58
110.30	1.06
111.20	1.10
112.20	0.20
113.15	0.14
115.05	2.67
117.00	3.92
119.05	19.89
120.15	16.60
121.15	10.94
122.20	2.73
123.15	1.97
124.10	0.30
126.15	0.13
127.90	0.88
129.20	0.66
130.15	0.43
131.15	2.20
133.00	35.51

134.20 7.70
 135.20 4.74
 136.20 2.00
 137.10 0.62
 138.10 0.12
 140.10 0.06
 141.10 0.22
 142.10 0.09
 143.10 0.10
 144.00 0.16
 144.75 0.33
 146.95 12.48
 148.20 8.05
 149.25 2.07
 150.15 0.28
 151.00 0.10
 161.00 13.00
 162.20 2.80
 163.20 1.10
 164.25 0.74
 165.45 0.16
 173.40 0.11
 175.10 4.01
 176.25 1.77
 177.45 0.18
 189.10 6.74
 190.30 0.96
 191.45 0.08
 204.20 2.68
 205.30 0.38
 206.45 0.09
 207.45 0.07

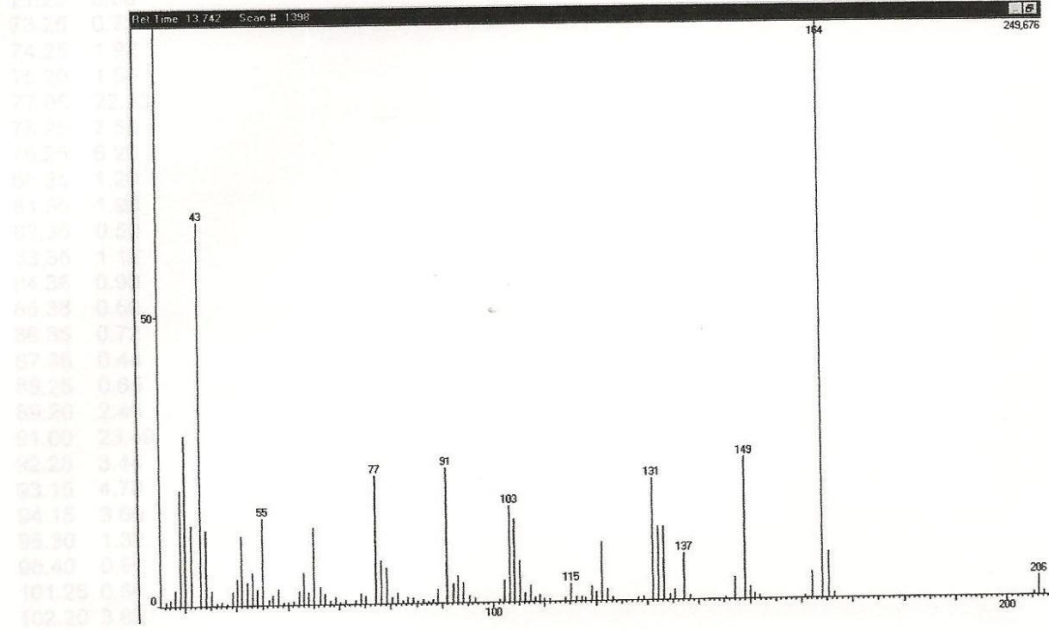
68.15	2.23	111.40	0.27	186.25	1
70.15	0.79	115.05	0.98	189.15	1
71.15	0.43	116.15	0.30	203.25	1
73.15	0.29	117.05	0.63	204.25	1
75.15	0.28	119.10	6.10	205.05	1
76.15	1.43	121.05	13.39	205.25	1

α - CARIOFILENO



34.80	0.30	69.15	2.23	111.40	0.27	165.25	0.30
35.80	0.39	70.15	0.79	115.05	0.96	189.15	1.15
36.80	0.58	71.15	0.43	116.15	0.30	203.20	0.29
39.00	17.78	73.15	0.29	117.05	0.63	204.25	2.57
40.05	18.17	75.15	0.28	119.10	6.10	205.00	0.60
41.10	28.31	76.15	1.43	121.05	18.39	206.85	0.32
42.20	4.23	77.15	14.14	122.20	3.65		
43.10	17.32	79.65	49.74	123.00	0.93		
44.10	6.28	81.20	5.57	123.95	0.24		
45.15	0.78	82.20	4.69	127.95	0.40		
46.10	0.40	83.45	0.56	128.95	0.41		
47.10	0.25	84.45	0.31	130.95	0.56		
48.55	0.38	86.45	0.33	131.90	0.23		
49.30	0.93	88.45	0.27	133.00	2.31		
50.10	0.99	89.75	1.09	134.25	1.31		
51.10	4.58	91.10	20.97	135.25	0.90		
52.95	15.17	92.95	100.00	136.30	0.90		
54.95	14.67	94.20	9.92	137.35	0.38		
56.10	1.19	95.15	5.68	141.35	0.26		
57.05	1.16	96.30	0.57	145.25	0.40		
58.10	1.70	97.30	0.33	146.00	0.77		
59.10	0.48	98.30	0.26	147.10	9.73		
61.10	0.29	102.25	0.51	148.25	2.27		
61.95	0.35	103.20	1.85	149.35	0.76		
62.60	0.57	104.05	1.00	151.35	0.24		
63.25	0.79	105.10	9.18	161.05	2.22		
65.05	7.69	106.95	14.28	162.25	0.69		
67.05	14.86	108.85	10.58	163.25	0.42		
68.20	3.11	110.40	0.53	164.20	1.22		

ACETATO DE ISOEUGENOL



36.20	0.91
37.20	1.17
38.05	2.88
39.10	20.15
40.05	29.57
41.20	14.05
42.95	66.35
44.05	13.09
45.10	2.69
46.15	0.59
47.15	0.61
48.15	0.45
49.20	2.46
50.05	4.70
51.05	12.15
52.10	4.07
53.10	5.71
54.05	2.82
55.10	15.11
56.30	0.91
57.00	1.80
58.10	2.87
59.10	0.51
60.10	0.49
61.10	0.62
62.25	2.48
63.15	5.72
64.00	2.15
65.10	13.40
66.25	3.09
67.20	1.96
68.25	0.72
69.25	1.33

70.25 0.43
 71.25 0.88
 73.25 0.73
 74.25 1.92
 75.20 1.50
 77.05 22.33
 78.25 7.58
 79.25 6.26
 80.35 1.20
 81.35 1.93
 82.35 0.50
 83.35 1.12
 84.35 0.99
 85.35 0.59
 86.35 0.72
 87.35 0.44
 88.25 0.65
 89.20 2.46
 91.00 23.49
 92.25 3.44
 93.15 4.78
 94.15 3.60
 95.30 1.32
 96.40 0.91
 101.25 0.54
 102.20 3.89
 103.15 16.86
 104.15 14.49
 105.10 7.22
 106.25 1.61
 107.20 2.92
 108.10 0.79
 109.00 1.33
 110.00 0.57
 111.00 0.51
 113.95 0.67
 115.15 3.16
 116.15 0.86
 117.15 0.88
 118.00 0.63
 119.10 2.64
 120.00 1.58
 121.10 10.24
 122.15 2.02

Arom

Compositio	...
...	...
...	...
...	...
...	...

ANEXO 6: Cromatografia de *Melaleuca alternifolia*

Composição e quantificação relativa de óleos essenciais

Shimadzu 14B/QP5050A

Coluna: BPX5 (non polar 5% polysilphenylene)

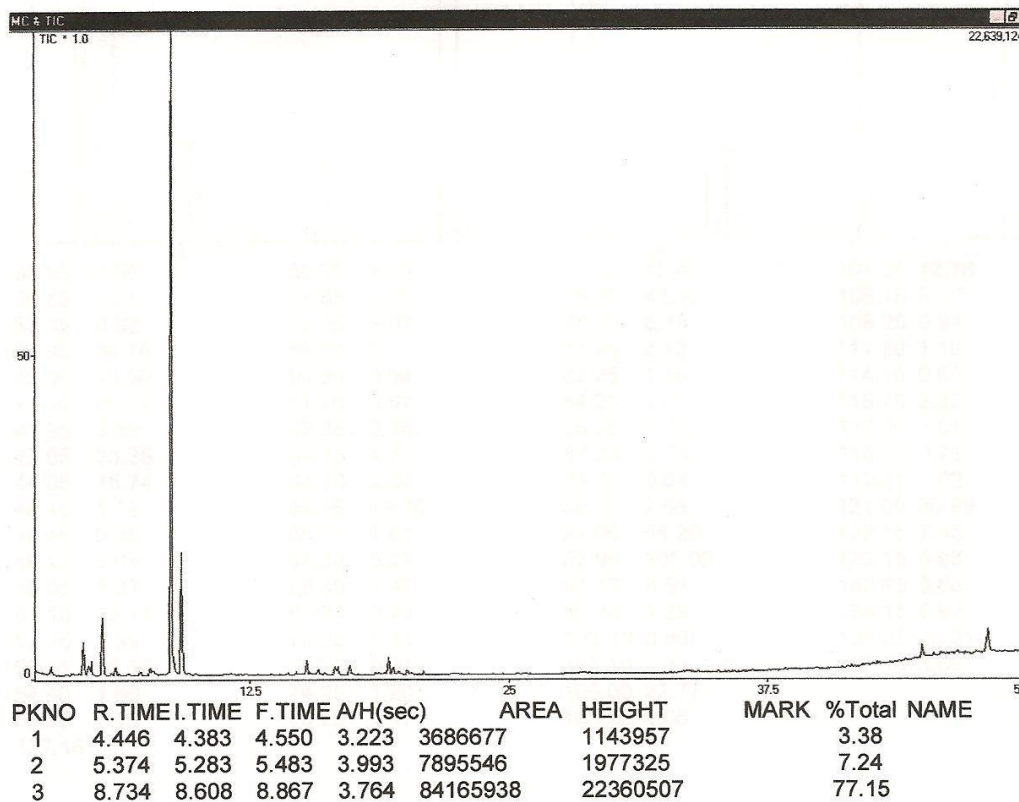
Temperatura inicial: 60 °C

Temperatura final: 280 °C

Gradiente: 5 °C/min

Melaleuca alternifolia Lote 2610210

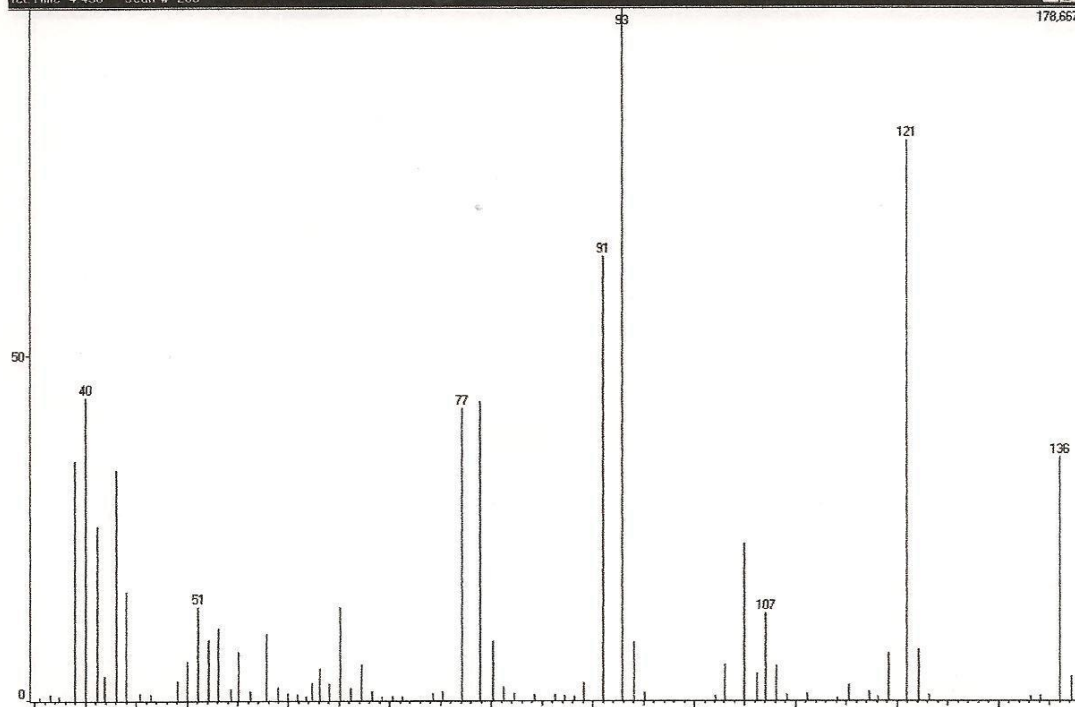
Composição	%
terpinoleno	3,38
γ -terpineno	7,24
4-terpineol	77,15



TERPINOLENO

Ret. Time: 4.450 Scan #: 283

151
178.657

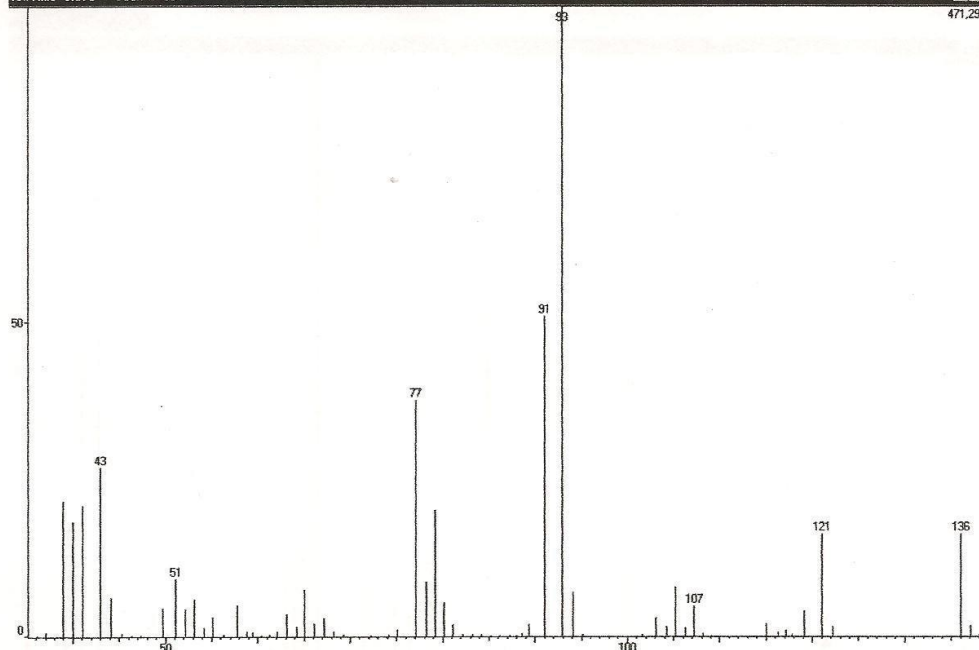


35.55	0.58	56.25	1.39	77.10	42.42	107.05	12.78
36.55	1.01	57.85	9.75	78.90	43.30	108.15	5.17
37.35	0.62	59.05	2.07	80.15	8.73	109.20	0.94
38.95	34.78	59.90	1.11	81.25	2.13	111.20	1.10
40.05	43.90	60.90	0.94	82.25	1.16	114.15	0.60
41.15	25.34	61.70	0.67	84.25	1.01	115.25	2.32
41.95	3.59	62.35	2.76	86.25	1.02	117.30	1.51
43.05	33.35	63.15	4.72	87.25	0.78	118.15	0.71
44.05	15.74	64.10	2.54	88.20	0.64	119.15	7.02
45.45	1.14	65.15	13.70	89.15	2.66	121.00	80.99
46.45	0.95	66.20	1.93	91.05	64.20	122.15	7.45
49.10	3.03	67.20	5.27	92.95	100.00	123.15	0.93
50.05	5.83	68.30	1.49	94.10	8.54	133.15	0.65
51.10	13.71	69.25	0.74	95.20	1.29	134.15	0.92
52.15	8.89	70.25	0.71	102.10	0.88	136.05	35.21
53.15	10.57	71.25	0.77	103.10	5.33	137.15	3.69
54.40	1.80	74.25	1.20	105.00	22.77		
55.15	7.18	75.25	1.47	106.20	4.06		
137.16							

γ-TERPINENO

Ret. Time 5.375 Scan # 294

471.239

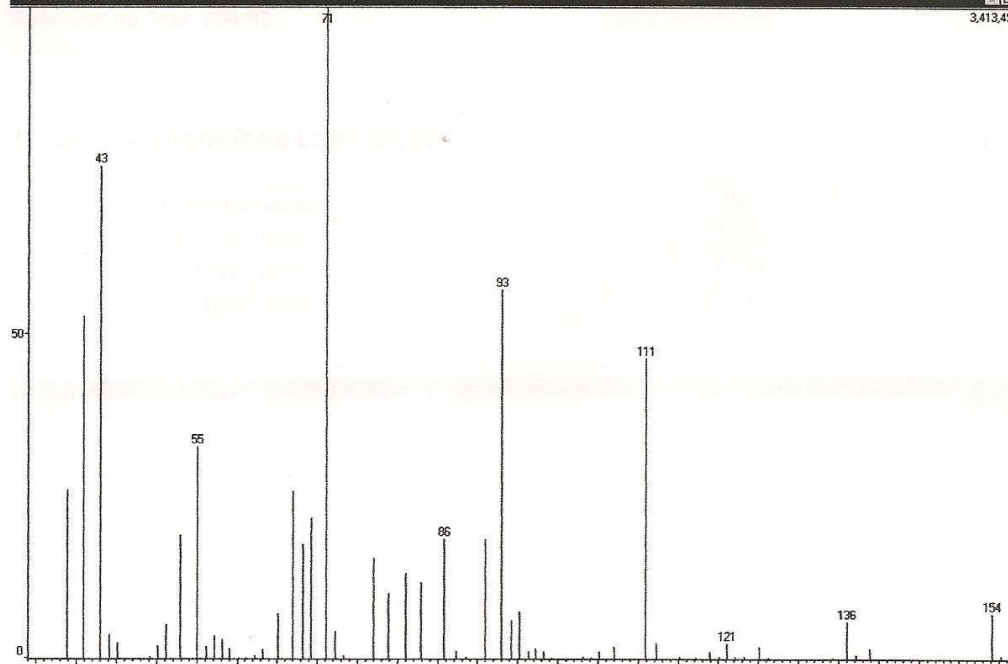


36.15	0.27	58.85	0.90	80.20	5.48	105.15	7.92
37.10	0.65	59.40	0.65	81.15	1.85	106.20	1.51
38.95	21.47	60.40	0.24	82.20	0.33	107.15	4.89
40.00	18.24	61.20	0.33	83.20	0.36	108.15	0.54
41.10	20.84	62.05	0.92	84.20	0.36	109.05	0.21
43.00	27.00	63.10	3.63	85.20	0.29	115.05	2.06
44.10	6.26	64.20	1.58	86.20	0.28	116.25	0.72
45.30	0.60	65.10	7.48	87.20	0.27	117.10	1.06
46.30	0.22	66.15	2.01	88.00	0.23	117.75	0.34
47.30	0.22	67.20	3.00	88.65	0.56	119.10	4.11
49.75	4.58	68.20	0.87	89.30	1.86	121.05	16.34
51.05	9.16	69.25	0.35	91.05	50.84	122.20	1.68
52.15	4.42	72.25	0.23	92.90	100.00	136.00	16.28
53.10	5.98	74.10	0.41	94.15	7.09	137.05	1.72
54.20	1.49	75.05	1.18	95.15	0.44	138.0	0.32
55.15	3.14	77.05	37.63	101.65	0.38		
56.25	0.42	78.25	8.74	103.10	3.07		
57.75	5.02	79.20	20.18	104.20	1.70		
139.0							

4-TERPINEOL

Ret Time 8.733 Scan # 797

3,413,490



34.95	0.05	61.10	0.27	95.15	7.25	121.10	2.41
36.15	0.13	62.20	0.54	96.30	1.18	122.05	0.32
38.90	26.01	63.15	1.42	97.20	1.63	123.15	0.33
40.90	52.75	65.05	7.01	98.20	1.10	125.05	1.94
42.95	75.72	67.00	25.84	99.20	0.23	126.20	0.16
44.15	3.82	68.20	17.62	100.30	0.05	128.35	0.05
45.10	2.52	69.20	21.62	101.30	0.05	132.35	0.06
46.10	0.13	71.05	100.00	102.30	0.15	133.65	0.12
47.20	0.11	72.20	4.30	103.10	0.42	134.30	0.17
48.00	0.10	73.25	0.49	104.15	0.28	136.05	5.82
49.10	0.40	76.95	15.46	105.15	1.18	137.15	0.74
50.15	2.16	78.90	10.05	106.95	1.89	138.95	1.57
51.15	5.29	81.00	13.20	110.85	46.18	140.05	0.13
52.95	19.10	82.90	11.80	112.25	2.54	140.90	0.06
55.00	32.56	85.85	18.39	113.75	0.09	151.80	0.07
56.20	1.99	87.25	1.09	115.15	0.36	154.05	7.06
57.15	3.67	88.60	0.33	116.30	0.09	155.25	0.48
58.15	3.07	91.00	18.42	117.15	0.29	156.35	0.04
59.10	1.68	92.95	56.66	118.95	1.15		
60.15	0.18	94.20	6.02	120.10	0.37		
156.36							

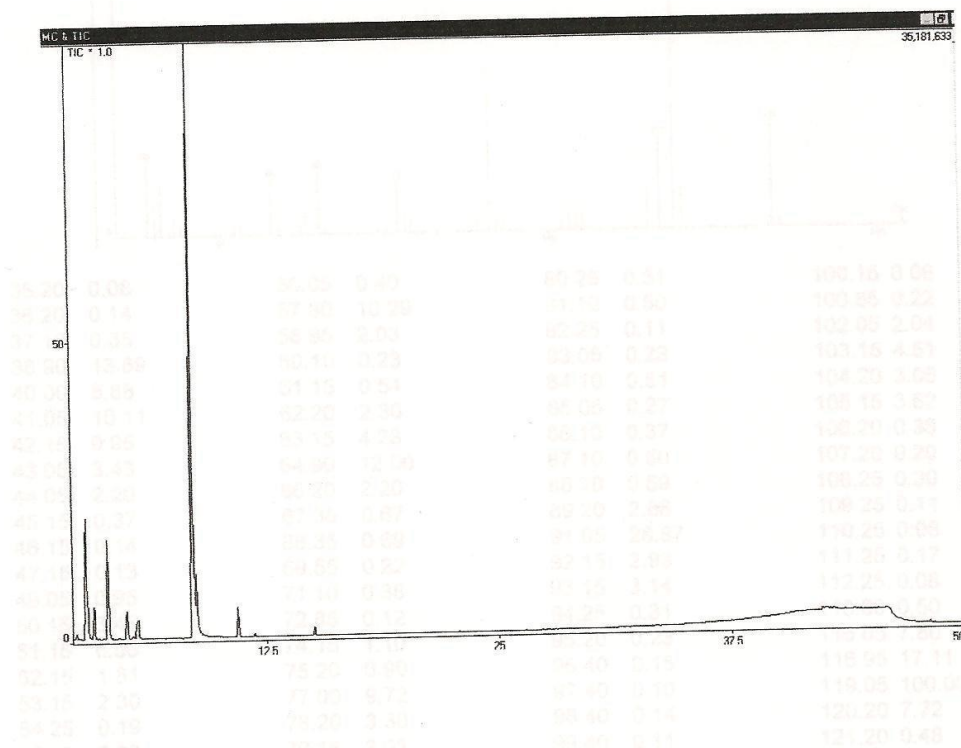
ANEXO 7: Cromatografia de *Thymus vulgaris*

Composição e quantificação relativa de óleos essenciais

Shimadzu 14B/QP5050A
 Coluna: BPX5 (non polar 5% polysilphenylene)
 Temperatura inicial: 60 °C
 Temperatura final: 280 °C
 Gradiente: 5 °C/min

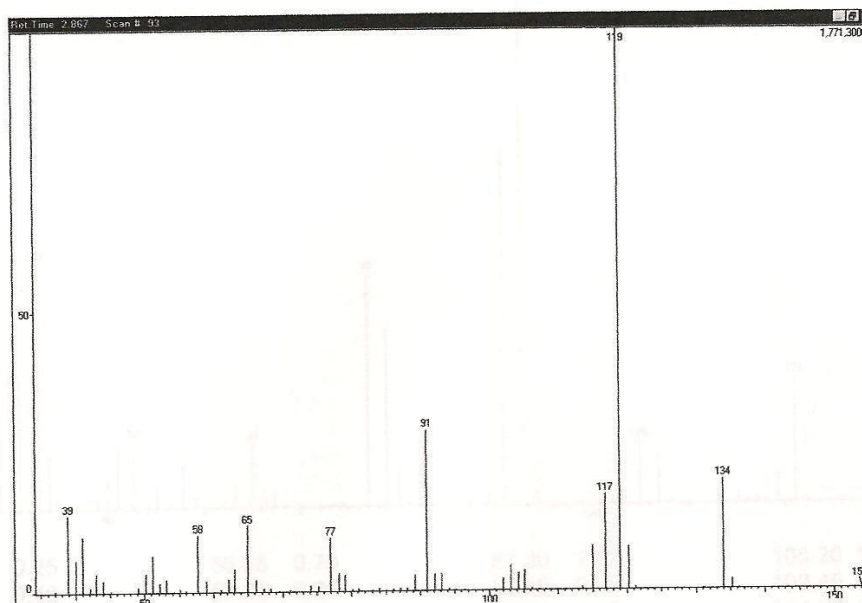
Thymus vulgaris Lote 10081009

Composição	%
cimeno	14,43
γ -terpineno	2,55
linalool	8,49
canfora	2,37
borneol	1,34
terpineol	1,47
timol	62,13
carvacrol	5,08
β -cariofileno	2,15



PKNO	R.TIME	I.TIME	F.TIME	A/H(sec)	AREA	HEIGHT	MARK	%Total	NAME
1	2.840	2.725	3.067	5.614	39556017	7046380		14.43	
2	3.265	3.192	3.392	4.012	6985823	1741140		2.55	
3	3.989	3.875	4.125	4.047	23269955	5750477		8.49	
4	5.005	4.925	5.117	4.002	6502017	1624724		2.37	
5	5.538	5.458	5.592	3.822	3670431	960349	1.34		
6	5.642	5.592	5.742	3.819	4026166	1054251	V	1.47	
7	8.610	8.467	8.708	4.889	170366118	34850028		62.13	
8	8.748	8.708	8.925	4.020	13942456	3468564	V	5.08	
9	10.978	10.900	11.083	3.494	5897194	1687764		2.15	

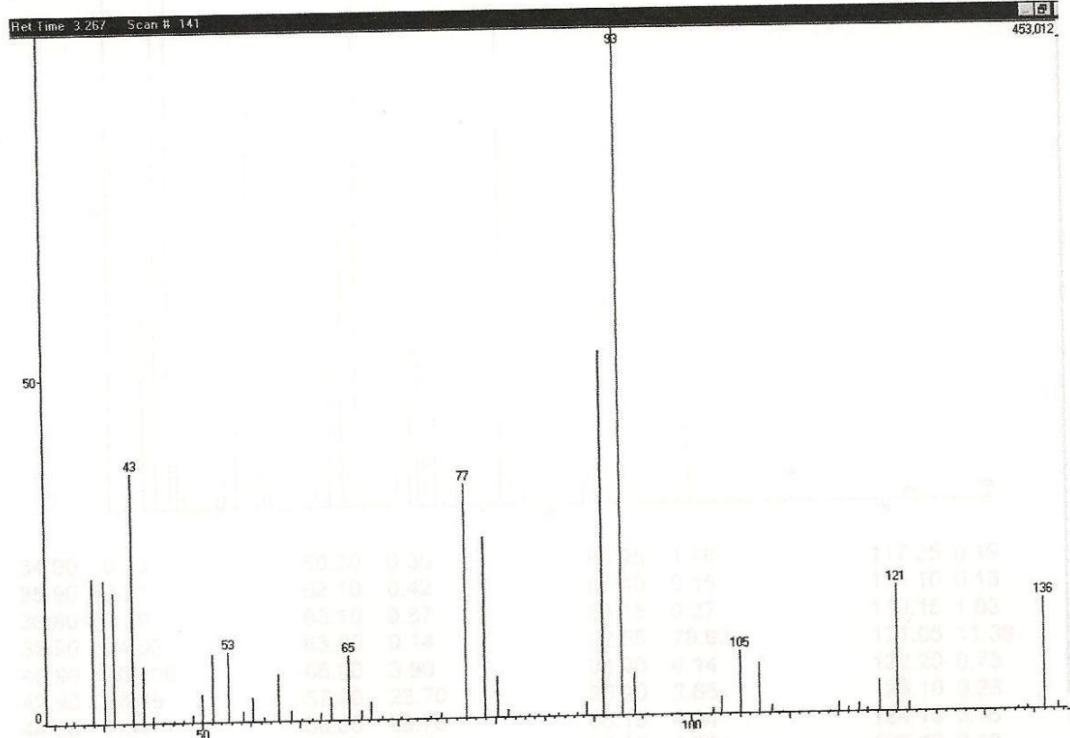
CIMENO



35.20	0.08	56.05	0.40	80.25	0.31	100.15	0.06
36.20	0.14	57.80	10.29	81.10	0.50	100.85	0.22
37.10	0.35	58.95	2.03	82.25	0.11	102.05	2.04
38.90	13.89	60.10	0.23	83.05	0.23	103.15	4.51
40.00	5.88	61.15	0.54	84.10	0.51	104.20	3.06
41.05	10.11	62.20	2.30	85.05	0.27	105.15	3.62
42.15	0.95	63.15	4.23	86.10	0.37	106.20	0.38
43.05	3.43	64.90	12.00	87.10	0.50	107.20	0.20
44.05	2.20	66.20	2.20	88.20	0.59	108.25	0.30
45.15	0.37	67.35	0.67	89.20	2.86	109.25	0.11
46.15	0.14	68.35	0.69	91.05	28.87	110.25	0.08
47.15	0.13	69.55	0.22	92.15	2.93	111.25	0.17
49.05	0.95	71.10	0.38	93.15	3.14	112.25	0.08
50.15	3.46	72.85	0.12	94.25	0.31	113.60	0.50
51.15	6.56	74.15	1.10	95.20	0.23	115.05	7.80
52.15	1.81	75.20	0.99	96.40	0.15	116.95	17.11
53.15	2.30	77.00	9.72	97.40	0.10	119.05	100.00
54.25	0.19	78.20	3.30	98.40	0.14	120.20	7.72
55.10	0.62	79.15	3.03	99.40	0.11	121.20	0.48

126.30 0.08	129.15 0.11	135.20 1.74	154.10 0.14
127.35 0.25	130.15 0.08	136.25 0.18	
128.15 0.29	131.20 0.30	138.20 0.11	
	134.00 19.66	139.20 0.14	

γ-TERPINENO



35.10 0.25	56.35 0.70	81.30 1.12	108.20 1.21
36.10 0.46	57.85 6.86	82.40 0.23	109.40 0.22
36.90 0.47	59.15 1.55	83.40 0.42	114.25 0.24
38.90 21.23	60.25 0.33	84.40 0.37	115.05 1.45
40.10 20.88	61.25 0.32	85.40 0.32	116.05 0.75
41.10 19.10	62.15 1.07	86.40 0.49	117.15 1.22
43.00 36.47	63.15 3.49	87.40 0.23	117.95 0.51
44.10 8.29	65.05 9.53	88.30 0.50	119.20 4.65
45.05 0.96	66.30 1.42	89.25 2.07	121.05 18.44
46.10 0.25	67.25 2.70	91.05 53.18	122.20 1.30
47.10 0.31	68.40 0.59	92.90 100.00	123.35 0.26
48.10 0.34	69.40 0.29	94.25 6.12	133.35 0.34
49.05 1.17	70.40 0.35	95.50 0.28	134.35 0.52
50.00 4.14	73.40 0.39	98.50 0.24	136.05 16.29
51.10 9.96	74.40 0.83	102.20 0.84	137.40 1.05
52.75 10.26	77.00 34.10	103.15 2.48	
54.20 1.60	78.90 26.38	105.00 9.19	
55.15 3.54	80.20 5.94	106.95 7.36	
137.41			