

**Priscilla Lima de Oliveira**

**ATIVIDADE *in vitro* DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES DE PLANTAS  
DA FAMÍLIA LAMIACEAE SOBRE *Candida albicans***

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

**Co-orientadora:** Profa. Dra. Patrícia de Souza Santos

**São Paulo**

**2021**

## FICHA CATALOGRÁFICA

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

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Oliveira, Priscilla Lima de

Atividade *in vitro* de óleos essenciais de espécies de plantas da família Lamiaceae sobre *Candida albicans* / Priscilla Lima de Oliveira. – 2020.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2020.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientação: Prof(a). Dra. Maria de Fátima Costa Pires.

Co-orientação: Prof(a). Dra. Patrícia de Souza Santos

1. *Candida Albicans*/crescimento & desenvolvimento.
2. Óleos Voláteis/análise.
3. *Rosmarinus*/microbiologia.
4. *Origanum*/microbiologia.
5. *Ocimum basilicum*/microbiologia.
6. *Salvia sclarea*.

SES/CCD/CD - 426/2020

Elaborada por Lilian Nunes Schiavon CRB 8/4083

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.

## DEDICATÓRIA

*Todas as minhas escolhas, ao longo de muitos anos, foram baseadas em sua  
espera. Foram longos anos.*

*Inesperadamente você está aqui. E agora só isso importa!  
Você me fez seguir em frente e por isso, eu dedico este trabalho a você meu  
filho Joshua Guilherme.*

## AGRADECIMENTOS

*Muitas pessoas foram importantes durante este período contribuindo direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.*

*Agradeço a Deus.*

*Deus conhece muito bem seus filhos, disso eu tenho certeza. Escolheu a forma mais dura para mostrar o meu propósito na vida. Eu entendi. O rancor envenena o corpo e adoece a mente. Obrigada pelos anjos que colocou em meu caminho (Dr. Cardim e Seu Policarpo), obrigada por me ouvir, obrigada por cuidar da minha família, obrigada por manter o controle quando eu não pude controlar.*

*Agradeço ao Lar Espírita Samaritano.*

*O meu ponto de equilíbrio, paz e de reforma íntima.*

*Agradeço minha família.*

*Meu marido Leandro Mariotto por me apoiar na decisão de fazer mestrado e compreender a importância disso para mim, e da escolha de ter deixado grandes oportunidades de carreira para trás. Obrigada meu amor por enfrentar comigo todas as dificuldades que esta decisão nos trouxe. Sobrevivemos não é mesmo?!*

*Aos meus pais e irmãs por entenderem as minhas ausências aos finais de semana, feriados, festas de aniversário e outras tantas comemorações. Obrigada por todo apoio, paciência e pelas visitas surpresas. Agradeço minha sogra por todo cuidado e carinho comigo e por sempre trazer aquele cafezinho nas horas certas.*

*Agradeço meus amigos.*

*Sou abençoada por ter amigos tão especiais. Amigos e professores do MBA em Gestão de Saúde da FGV, que transformavam meus sábados de intenso estudo, no melhor dia da semana. Vocês fizeram parte de um momento muito importante da minha vida e com a ajuda de vocês pude concluir o MBA durante o desenvolvimento do meu projeto de mestrado. Saudade infinita desse tempo Andrea, Aline, Bruna, Cely, Edu, Elisa, Maysa, Roger, o grupo Parmegiana.*

*Todos os meus amigos do Instituto Adolfo Lutz. Essa Instituição foi responsável pela minha paixão por Saúde Pública. Ter feito o Aprimoramento Profissional fez toda a diferença no início da minha carreira. Sempre fui grata a Instituição por todas as oportunidades que me aconteceram e pelo*

*amadurecimento da minha visão de epidemiológica que me proporcionou. Meu primeiro PCR em tempo real, meu primeiro artigo, meu primeiro projeto e o prêmio SUS de Ciência e Tecnologia. Não foi por acaso que decidi voltar e encerrar aqui minhas atividades em pesquisa e seguir uma nova trajetória expandindo os horizontes da saúde. Obrigada Maristela, Gisele, Claudio Sacchi, Lucila, Fabinho e Têre eu voltei por causa de vocês.*

*Meus amigos do projeto Zika Alda, Camila, Isaura, Kely e toda a turma. Deu zica, mas virou amizade! Desejo todo o sucesso do mundo para vocês. Com certeza havia um propósito nesse encontro. Eu faria tudo de novo!*

*Meus companheiros de jornada: Marcos Guilherme e Co-orientadora Patrícia. Vocês foram indispensáveis e fenomenais durante esse período. Obrigada por rirem junto comigo e deixar tudo mais leve. Paty você foi mais que uma orientação de projeto, você foi uma grande amiga. Foi um prazer dividir a bancada com vocês.*

*Ao meu grande amigo Raphael Zampiere pela força com o Abstract. Afinal todos devem ter pelo menos um amigo médico, um amigo advogado e um amigo professor de inglês.*

*Agradeço minha orientadora Maria de Fátima.*

*Eu tive o prazer de ser orientada por uma pessoa que realmente se importa com pesquisa e com a formação de pessoas. Não é a toa que a senhora está à frente de uma Pós-Graduação. Foi uma aventura estudar e desenvolver um trabalho em um campo totalmente diverso do que eu estava acostumada. Obrigada por ter me proporcionado tanto conhecimento. Que Deus permita longos anos de vida e muita saúde (e paciência também). Muitos outros virão em busca de um caminho de conhecimento e espero que tenham a mesma sorte que eu tive. A senhora é responsável por não deixar apagar a centelha do amor pela ciência. Obrigada por ter aparecido em meu caminho.*

## ÍNDICE

<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b>	<b>10</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>11</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>12</b>
<b>RESUMO</b>	<b>14</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>15</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
1.1 <i>Candida albicans</i>	16
1.2 Antifúngicos sintéticos	18
1.3 Antifúngicos naturais	18
1.4 Óleos essenciais	19
1.4.1 Espécies vegetais dos óleos essenciais estudados	20
1.4.1.1 <i>Ocimum basilicum</i> L - Manjeriço	20
1.4.1.2 <i>Origanum majorana</i> L - Manjerona	21
1.4.1.3 <i>Origanum vulgare</i> L - Orégano	23
1.4.1.4 <i>Rosmarinus officinalis</i> L - Alecrim	24
1.4.1.5 <i>Salvia sclarea</i> L - Sálvia	25
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivos específicos	27
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>28</b>
3.1 Isolados biológicos: <i>Candida albicans</i>	28
3.2 Pesquisa de tubo germinativo (Teste de Reynolds-Braude, 1956)	28
3.3 Tipagem fenotípica	28
3.4 Óleo essencial	29
3.5 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antifúngica dos óleos essenciais e dos compostos químicos sobre os isolados de <i>C. albicans</i> .	29
3.5.1 Preparação da suspensão de leveduras	29
3.5.2 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antifúngica dos óleos essenciais e dos compostos químicos	30
3.6 Controles	30
3.7 Determinação da concentração fungicida mínima	30
3.8 Controles de qualidade e biossegurança	31

3.9 Descartes de resíduos	31
<b>4. RESULTADO</b>	<b>32</b>
4.1 <i>Candida albicans</i>	32
4.2 Características dos óleos essenciais de <i>Ocimum basilicum</i> L, <i>Origanum majorana</i> L, <i>Origanum vulgare</i> L, <i>Rosmarinus officinalis</i> L e <i>Salvia sclarea</i> L	32
4.2.1 <i>Ocimum basilicum</i> L	32
4.2.2 <i>Origanum majorana</i> L	33
4.2.3 <i>Origanum vulgare</i> L	33
4.2.4 <i>Rosmarinus officinalis</i> L	33
4.2.5 <i>Salvia sclarea</i> L	33
4.3 Atividade <i>in vitro</i> do óleo essencial de <i>O. basilicum</i> L sobre os isolados de <i>C. albicans</i>	34
4.4 Atividade <i>in vitro</i> do óleo essencial de <i>O. majorana</i> L sobre os isolados de <i>C. albicans</i> .	36
4.5 Atividade <i>in vitro</i> do óleo essencial de <i>O. vulgare</i> L sobre os isolados de <i>C. albicans</i>	38
4.6 Atividade <i>in vitro</i> do óleo essencial de <i>R. officinalis</i> L sobre os isolados de <i>C. albicans</i> .	40
4.7 Atividade <i>in vitro</i> do óleo essencial de <i>S. sclarea</i> L sobre os isolados de <i>C. albicans</i>	42
4.8 Atividade do composto químico carvacrol do óleo essencial de <i>O. vulgare</i> L sobre isolados de <i>C. albicans</i>	46
4.9 Atividade do composto químico Y- terpineno do óleo essencial de <i>O. vulgare</i> L sobre isolados de <i>C. albicans</i>	48
4.10 Atividade do composto químico linalol do óleo essencial de <i>O. vulgare</i> L sobre isolados de <i>C. albicans</i>	50
4.11 Atividade do composto químico p-cinemo do óleo essencial de <i>O. vulgare</i> L sobre isolados de <i>C. albicans</i>	52
4.12 Atividade do composto químico timol do óleo essencial de <i>O. vulgare</i> L sobre isolados de <i>C. albicans</i>	53
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>57</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>64</b>
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>65</b>



<b>8. ANEXOS</b>	<b>87</b>
<b>Anexo 1.</b> Laudo técnico do Óleo essencial de Manjeriçãõ ( <i>Ocimum basilicum</i> )	<b>87</b>
<b>Anexo 2.</b> Laudo técnico do Óleo essencial de Manjerona ( <i>Origanum majorana</i> )	<b>88</b>
<b>Anexo 3.</b> Laudo técnico do Óleo essencial de Orégano ( <i>Origanum vulgare</i> )	<b>89</b>
<b>Anexo 4.</b> Laudo técnico do Óleo essencial de Alecrim ( <i>Rosmarinus officinales</i> )	<b>90</b>
<b>Anexo 5.</b> Laudo técnico do Óleo essencial de Sálvia ( <i>Salvia sclarea</i> )	<b>91</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**AIDS:** Síndrome da imunodeficiência adquirida.

**ATCC:** *American Type Culture Collection.*

**°C:** graus Celsius.

**CFM:** concentração fungicida mínima.

**CFM<sub>50</sub>:** CFM capaz de inibir o crescimento de 50% dos Isolados.

**CFM<sub>90</sub>:** CFM capaz de inibir o crescimento de 90% dos Isolados.

**CIM:** concentração inibitória mínima.

**cm:** centímetro.

**dc:** diâmetro da colônia.

**EPC:** equipamento de proteção coletiva.

**EPI:** equipamento de proteção individual.

**et al.:** e outros.

**FDA:** *Food and Drug Administration*

**g:** grama.

**HIV:** vírus da imunodeficiência humana - *Human Immunodeficiency Vírus.*

**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 – *Phospate Buffer Solution.*

**Pz:** índice de atividade enzimática.

**RPMI:** *Roswell Park Memorial Institute Médium.*

**UFC:** Unidade formadora de colônia

**µg:** micrograma.

**µm:** micrômetro.

**µL:** microlitro.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Folhas e flores de <i>Ocimum basilicum</i> L (Manjericão)	<b>20</b>
<b>Figura 2.</b> Folhas e flores de <i>Origanum majorana</i> L (Manjerona)	<b>21</b>
<b>Figura 3.</b> Folhas e flores de <i>Origanum vulgare</i> L (Orégano)	<b>23</b>
<b>Figura 4.</b> Folhas e flores de <i>Rosmarinus officinales</i> L (Alecrim)	<b>24</b>
<b>Figura 5.</b> Folhas e flores de <i>Salvia sclarea</i> L (Sálvia)	<b>25</b>
<b>Micrografia 1.</b> Presença de clamidoconídeos, blastoconídeos, pseudohifas e hifas verdadeiras	<b>32</b>

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Concentração Fungicida Mínima, formação de tubo germinativo e morfotipos de *Candida albicans* antes e após contato com o óleo essencial de *Ocimum basilicum* L. **35**
- Tabela 2.** Concentração Fungicida Mínima, formação de tubo germinativo e morfotipos de *Candida albicans* antes e após contato com o óleo essencial de *Origanum majorana* L. **37**
- Tabela 3.** Concentração Fungicida Mínima, formação de tubo germinativo e morfotipos de *Candida albicans* antes e após contato com o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. **39**
- Tabela 4.** Concentração Fungicida Mínima, formação de tubo germinativo e morfotipos de *Candida albicans* antes e após contato com o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. **41**
- Tabela 5.** Concentração Fungicida Mínima, formação de tubo germinativo e morfotipos de *Candida albicans* antes e após contato com o óleo essencial de *Salvia sclarea* L. **43**
- Tabela 6.** Valores de CFM50/CFM90 dos óleos essenciais de *Ocimum basilicum* L, *Origanum majorana* L, *Origanum vulgare* L, *Rosmarinus officinalis* L e *Salvia sclarea* L sobre isolados de *C. albicans* de origem humana. **44**
- Tabela 7.** Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima dos óleos essenciais de *Ocimum basilicum* L, *Origanum majorana* L, *Origanum vulgare* L, *Rosmarinus officinalis* L e *Salvia sclarea* L. sobre isolados de *C. albicans* de origem humana. **45**
- Tabela 8.** Concentração Fungicida Mínima, formação de tubo germinativo e morfotipos sobre *Candida albicans* antes e após contato com o composto químico carvacrol do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. **47**
- Tabela 9.** Concentração Fungicida Mínima, formação de tubo germinativo e morfotipos sobre *Candida albicans* antes e após contato com o composto químico Y- terpineno do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. **49**
- Tabela 10.** Concentração Fungicida Mínima, formação de tubo germinativo e morfotipos sobre *Candida albicans* antes e após contato com o composto químico Linalol do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. **51**

- Tabela 11.** Concentração Fungicida Mínima, formação de tubo germinativo e morfotipos sobre *Candida albicans* antes e após contato com o composto químico P-Cimeno do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. **52**
- Tabela 12.** Concentração Fungicida Mínima, formação de tubo germinativo e morfotipos sobre *Candida albicans* antes e após contato com o composto químico Timol do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. **54**
- Tabela 13.** Valores de CFM50 e CFM90 dos compostos químicos Carvacrol; Y- terpineno; Para- cimeno; Linalol e Timol; do óleo essencial de *Origanum vulgare* L, sobre isolados de *C. albicans* de origem humana. **55**
- Tabela 14.** Média, desvio padrão, máxima e mínima dos compostos químicos Carvacrol; Y- terpineno; Para-cimeno; Linalol e Timol; do óleo essencial de *Origanum vulgare* L, sobre isolados de *Candida albicans* de origem humana. **56**

## RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar *in vitro* a atividade de cinco óleos essenciais de plantas da família Lamiaceae, muito conhecidas na culinária brasileira: *Ocimum basilicum* L, *Origanum majorana* L, *Origanum vulgare* L, *Rosmarinus officinalis* L e *Salvia sclarea* L, bem como os compostos químicos do óleo essencial com a menor concentração fungicida mínima sobre 16 isolados biológicos de *Candida albicans*. Determinar as concentrações fungicidas mínimas, o efeito dos óleos e dos compostos químicos em doses subinibitórias sobre a formação de tubo germinativo e a produção de franjas, nos isolados de *C. albicans*, antes e após contato com os diferentes óleos essenciais e os compostos químicos. Nesse estudo, todos os cinco óleos essenciais apresentaram atividade antimicrobiana sobre os isolados de *C. albicans*: *O. vulgare* apresentou CFM 90 de 1,5µg/mL, seguido pelos óleos essenciais de *O. marajoana* 2,6 µg/mL, *S. sclarea* 21,93µg/mL, *R. officinalis* 80,85µg/mL e *O. basilicum* 92,25 µg/mL. Nas doses sub inibitórias os óleos essenciais de *O. vulgare*, *R. officinalis* e *S. sclarea* inibiram em mais de 80% dos isolados de *C. albicans* a formação de tubo germinativo e alteraram a produção de franjas em mais de 70% dos isolados de *C. albicans*. O óleo essencial de *O. vulgare* foi o que apresentou a menor concentração fungicida sobre os isolados de *C. albicans*. O composto químico carvacrol do óleo essencial de *O. vulgare* foi o que apresentou a menor concentração fungicida sobre os isolados de *C. albicans* e a menor CFM90 0,69 µg/mL. Com excessão do p-cinemo todos os compostos químicos do óleo essencial de *O. vulgare* inibiram a formação de tubo germinativo e inibiram a produção de franja. Pelo exposto e nas condições desse estudo, conclui-se que o óleo essencial de *O. vulgare* e o composto químico carvacrol apresentaram a menor concentração fungicida sobre os isolados biológicos de *C. albicans*.

**Palavras chaves:** *Candida albicans*/crescimento & desenvolvimento. 2. Óleos Voláteis/análise. 3. *Rosmarinus*/microbiologia. 4. *Origanum*/ microbiologia. 5. *Ocimum basilicum*/microbiologia. 6. *Salvia sclarea*.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate in vitro the activity of five essential oils from plants of the Lamiaceae family, well known in Brazilian cuisine: *Ocimum basilicum* L, *Origanum majorana* L, *Origanum vulgare* L, *Rosmarinus officinalis* L and *Salvia sclarea* L, as well as the compounds essential oil chemicals with the lowest minimum fungicide concentration on 16 biological isolates of *Candida albicans*. To determine the minimum fungicidal concentrations, the effect of oils and chemical compounds in subinhibitory doses on the formation of germ tube and the production of fringes, in the isolates of *C. albicans*, before and after contact with the different essential oils and chemical compounds. In this study, all five essential oils showed antimicrobial activity against *C. albicans* isolates: *O. vulgare* presented CFM 90 of 1.5µg / mL, followed by essential oils of *O. marajoana* 2.6 µg / mL, *S. sclarea* 21.93µg / mL, *R. officinalis* 80.85µg / mL and *O. basilicum* 92.25 µg / mL. In the sub-inhibitory doses, the essential oils of *O. vulgare*, *R. officinalis* and *S. sclarea* inhibited the formation of a germ tube in more than 80% of the *C. albicans* isolates and altered the fringe production in more than 70% of the isolates of *C. albicans*. The essential oil of *O. vulgare* was the one with the lowest fungicidal concentration on *C. albicans* isolates. The chemical compound carvacrol in the essential oil of *O. vulgare* was the one with the lowest fungicidal concentration on *C. albicans* isolates and the lowest CFM90 0.69 µg / mL. With the exception of p-cinemo, all the chemical compounds of the essential oil of *O. vulgare* inhibited the formation of a germ tube and inhibited the production of fringe. From the above and in the conditions of this study, it is concluded that the essential oil of *O. vulgare* and the chemical compound carvacrol showed the lowest fungicidal concentration on the biological isolates of *C. albicans*.

**Keywords:** *Candida albicans* / growth & development. 2. Oils Volatiles / analysis. 3. *Rosmarinus* / microbiology. 4. *Origanum* / microbiology. 5. *Ocimum basilicum* / microbiology. 6. *Salvia sclarea*.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 *Candida albicans*

Leveduras do gênero *Candida* fazem parte, como comensais, da microbiota normal dos seres humanos saudáveis. Quando ocorre um desequilíbrio entre a microbiota e o sistema imunológico do hospedeiro, essas leveduras podem ser tornar patogênica, causando a candidíase e apresentando diferentes formas clínicas (Bezzera et al., 2019; Navarro-Arias et al., 2019).

*Candida albicans* ainda é a espécie fúngica mais isolada especialmente em indivíduos imunocomprometidos (Ndoricyimpaye et al., 2020), mas houve um aumento do número de infecções invasivas causadas por espécies não *albicans* tais como *Candida guilliermondii*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* (Ruiz et al., 2005; Pupulin et al., 2014; Navarro-Arias et al., 2019) e *C. auris*, uma levedura multirresistente descrita pela primeira vez no Japão em 2009 e relatada em 36 países de seis continentes (Sato et al., 2009; CCD, 2020, Lima et al., 2020).

Os principais fatores de virulência desse gênero incluem a capacidade de adesão, pré-requisito para a transformação da levedura de saprófita a patogênica (Samaranayake, 1992; Pires et al., 2001) e a produção de exoenzimas. Outras propriedades dessa levedura é a formação de tubo germinativo, a variabilidade fenotípica (Samaranayake, 1992), a capacidade de formar hifas e pseudohifas como mecanismo de escape à fagocitose (Kumar et al., 2006; Gacser et al., 2007; Pupulin, 2014; Shan-Ju et al., 2019), produção de metabólitos alergênicos, os quais podem desencadear manifestações de hipersensibilidade tanto do tipo imediato, quanto do tipo tardio. O progresso da infecção está relacionado com uma combinação de fatores, como a virulência da cepa e as desordens imunológicas do hospedeiro. (Furlaneto-Maia et al., 2008; Grubb et al., 2009; Rorig et al., 2009; Pupulin, 2014; Shan-Ju et al., 2019).

A morfotipagem é uma técnica que caracteriza *C. albicans* macroscopicamente com relação às diferenças de tamanho e textura de franjas marginais e da superfície das colônias no meio ágar extrato de malte, que pode identificar um morfotipo distinto com capacidade de virulência, onde franjas



descontínuas estão presentes geralmente em isolados de infecções sistêmicas fatais. O índice de reprodutibilidade é de 84% para os isolados idênticos e de 96% para o morfotipo com diferença em um caractere (Phongpaichit et al., 1987, modificado por Hunter et al., 1989).

Atualmente considera-se que alterações genéticas e epigenéticas no hospedeiro e no patógeno e mudanças no microambiente podem levar a candidíase de uma infecção local até uma infecção disseminada (Shan-Ju et al., 2019).

As infecções fúngicas invasivas, sobretudo a candidemia, tornou-se um problema de saúde pública, sendo a quarta mais frequente infecção nosocomial da corrente sanguínea (Ejembi et al., 2018), com alta taxa de mortalidade, sobretudo, em pacientes imunocomprometidos (Tso et al., 2018).

*C. albicans* tem atraído atenção de pesquisadores em relação a capacidade dessa levedura em explorar a interface entre um comensal a um patógeno, por possuir características singulares em relação ao seu ciclo de vida, permitindo o crescimento em diferentes locais no hospedeiro, a adaptação a condições provocadas pelo sistema imunológico ou pelo uso de antifúngicos e a diversidade intraespécie são fatores adicionais ao desenvolvimento da doença (Braunsdorf & LeibundGut-Landemann, 2018; Legrand et al., 2019).

No ambiente hospitalar o risco de adquirir uma infecção por *Candida* está especialmente relacionada a pacientes com comorbidades, submetidos a uma longa internação. Indivíduos que possuem desordens hematológicas, leucocitose, plaquetopenia, neutropenia, portadores da Síndrome da Imundeficiência Adquirida, fibrose cística; aos submetidos à cirurgia gastrointestinal ou que receberam transplantes de órgãos sólidos, bebês nascidos prematuramente e adultos com mais de 70 anos. Entre os pacientes internados, o tempo médio para o início da infecção por *Candida* é em torno de 22 dias após a internação (Pfaller e Castanheira, 2016).

Os efeitos das infecções fúngicas na saúde humana e as mortes resultantes delas, foram negligenciadas por muito tempo por órgãos públicos e privados de saúde. Um exemplo disso é a ausência de um programa de infecção fúngica pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e a pouca ou nenhuma vigilância das micoses na maioria das agências de Saúde Pública (Nucci & Marr, 2005; Brown et al., 2012; Ruiz & Pereira, 2016).

As infecções fúngicas invasivas nas últimas três décadas, influenciado pelo aumento do número de intervenções cirúrgicas invasivas, novas técnicas

imunossupressoras, contribuíram para identificar um aumento no número de casos da doença, o que torna imprescindível novos produtos para o tratamento dessas infecções (Nucci & Marr, 2005; Brown et al., 2012; Ruiz & Pereira, 2016; Giacomazzi et al., 2016; Bongomin et al., 2017).

## **1.2 Antifúngicos sintéticos**

São cinco as classes de fármacos usados para tratamento de infecções fúngicas: azóis, equinocandinas, polienos, análogos de pirimidina e alilaminas. Essa última é de uso tópico para tratamento de infecções superficiais por dermatófitos (Garcia & Adrio, 2017).

Dentre os azóis, o fluconazol, tem sido utilizado desde 1990 quando foi aprovado pela Food and Drug Administration (FDA, USA). Trata-se de um medicamento seguro o que torna a administração por via oral adequada para a maioria dos pacientes. A resistência de *C. albicans* ao fluconazol foi relatada em vários centros de atendimento de pacientes imunossuprimidos que faziam uso do fluconazol como profilaxia (Oxman et al., 2010; Pupulin, 2014).

As infecções fúngicas são de difícil tratamento e seus agentes etiológicos têm mostrado resistência à ação de antifúngicos. Diversos estudos têm indicado a resistência de *C. albicans* aos azóis (Pfaller & Castanheira, 2016), além da hepatotoxicidade e nefrotoxicidade ligados à utilização de polienos, notadamente a anfotericina B (Kauffman & Carver, 1997; Nascimento et al., 2007). Para evitar estes problemas, a procura por novos produtos eficientes e com baixa toxicidade se faz necessária (Abad, Ansuategui & Bermejo, 2007; Nascimento et al., 2007; Gazim, 2008; Hinrichsen, 2009; Pupulin, 2014).

## **1.3 Antifúngicos naturais**

O estudo com antifúngicos naturais 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, 2007; 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 possibilitando a aplicação em diversas doenças. Por vezes, uma única planta pode servir para mais de uma enfermidade quando aplicada como fitoterápico (Polachini, 2004). A maioria dos medicamentos sintéticos são originários de componentes ativos das plantas (Sallé, 1996).

A atividade antimicrobiana ocorre de diferentes fontes naturais, tais como: própolis, própolis verde (Abrahão, 2007; Oliveira, 2007; Silva, 2007; Makabe, Santos & Pires, 2018; Makabe, Santos & Pires, 2019), 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 muitos outros, sobre diferentes microrganismos (Leonardo et al., 2001; Pereira et al., 2004; Polachini, 2004; Li et al., 2005; Navas et al., 2006; Carreto, 2007).

A família Lamiaceae, com 236 gêneros de plantas é rica em óleos essenciais, com alto valor medicinal (Ramasubramania, 2012 e Carović-Stanko, 2016).

#### **1.4 Óleos essenciais**

Os óleos essenciais são parte dos elementos voláteis contidos em muitos órgãos vegetais e possui relação com as funções de sobrevivência e defesa dos vegetais contra os microrganismos (Siqui et al., 2000). Cerca de 60% dos óleos essenciais possuem propriedades antifúngicas e 35% apresentam propriedades antibacterianas (Bhavanani & Ballow, 1992).

Reconhecidos como substâncias seguras pelo Food and Drug Administration (FDA-USA), alguns óleos essenciais contêm compostos que podem ser utilizados como aditivos antibacterianos (Tian et al., 2014), ação antioxidante e antimicrobiana o que tornam os óleos essenciais cada vez mais populares (Hossain et al., 2016 ; Jallali et al., 2014).

O efeito antifúngico de diferentes óleos essenciais tem sido descrito em vários estudos. Como exemplo o tomilho (*Thymus vulgaris*) e o orégano (*Origanum vulgare*)

(Knoblock et al., 1989; Arras e Usai, 2001) sobre o gênero *Candida* (Nenoff, Haustein & Brant, 1996; Suresh, Sriram & Dhanara, 1997; Navickiene et al., 2006).

Métodos de investigação *in vitro* com óleos essenciais têm sido desenvolvidos para que produzam resultados confiáveis de maneira que possam ser reproduzidos e validados. No entanto, existem barreiras causadas pelas peculiaridades que os óleos apresentam, como: 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 a ser testado (Nascimento et al., 2007).

### 1.4.1 Espécies vegetais dos óleos essenciais

#### 1.4.1.1 *Ocimum basilicum* L – Manjeriço



Fonte: Canto das Flores 1

[http://www.unirio.br/ccbs/ibio/herbariohuni/imagens/ocimum\\_basilicum-canto-das-flores-1/view?searchterm=OCIMUM+BASILICUM](http://www.unirio.br/ccbs/ibio/herbariohuni/imagens/ocimum_basilicum-canto-das-flores-1/view?searchterm=OCIMUM+BASILICUM)

**Figura 1.** Folhas e flores de *Ocimum basilicum* L (Manjeriço)

*Ocimum basilicum* L. é uma planta da família Lamiaceae, com mais de 30 cm de altura, lenhosa ou sublenhosa, de aparência tenra; folhas ovaladas geralmente com mais de 1,4 cm de comprimento. Encontradas em regiões tropicais e subtropicais de Ásia, África e Américas. É considerada economicamente útil por causa das características naturais como produtoras de óleos essenciais, compostos principalmente de monoterpenos e sesquiterpenos (Lawrence, 1993).

O óleo essencial de manjeriço é utilizado na gastronomia como ingrediente alimentar para aromatizar, fabricação de cosméticos e na medicina popular para tratamento de tosse, inflamações e dores. Também tem sido usado como antioxidante, antimicrobiano, anti-hipertensivo, anticâncer e anti-inflamatório (Chávez-González, 2016). Na medicina Ayurveda e tradicional chinesa seu uso é indicado para tratar distúrbios do sistema digestório, diarreia, problemas renais e infecções; na medicina tradicional africana, usado para tratar a tosse e febre. Também foi estudado o potencial anti-inflamatório e antinociceptivo (Dzoyem et al., 2017).

O óleo essencial de *O. basilicum* L é composto por monoterpenos oxigenados (60,7-68,9%), seguidos por hidrocarbonetos sesquiterpenos (16,0-24,3%) e sesquiterpenos oxigenados (12,0-14,4%), o linalol foi o principal constituinte desse óleo essencial (56,7-60,6%), seguido pelo epi- $\alpha$ -cadinol (8,6- 1,4%),  $\alpha$ -bergamoteno (7,4-9,2%),  $\gamma$ -cadineno (3,3-5,4%), germacreno D (1,1- 3,3%) e cânfora (1,1-3,1%). Componentes como metilcavicol, metilcinamato, eugenol, cânfora, cis-geraniol, 1,8-cineol,  $\alpha$ -bergamoteno,  $\beta$ -cariofileno, germacreno D,  $\gamma$ -cadineno, epi- $\alpha$ -cadinol e viridiflorol foram relatados como componentes importantes (Chávez-González, 2016).

#### 1.4.1.2 *Origanum majorana* L – Manjerona



Fonte: [https://jb.utad.pt/especie/Origanum\\_majorana](https://jb.utad.pt/especie/Origanum_majorana)

**Figura 2.** Folhas e flores de *Origanum majorana* L (Manjerona)

*Origanum majorana* L é uma planta aromática rica em óleos essenciais pertencente à família Lamiaceae. Apresenta-se com um arbusto anão de lugares secos e rochosos, nativo de Chipre e da parte adjacente do sul da Turquia, é cultivada em

vários países da Europa, África, América e Ásia. Com até 60cm de altura apresenta folhas ovadas, esbranquiçadas ou acinzentadas, cálices de um lábio e corolas brancas com flores dispostas em espigões, formando uma inflorescência paniculada (Kokkini et al., 2003).

Essa planta popularmente conhecida como manjerona é utilizada na forma de infusões de ervas. Na medicina popular, utilizada para doenças respiratórias como asma, resfriado, congestão sinusal e tosse, mas também, distúrbios gastrointestinais, câibras, depressão, tontura, febre do feno, dor de cabeça, dor de dente e como diurético (El-Ashmawy, Saleh, and Salama, 2007; Ramadan, El-Beih, e Zahra, 2012). As folhas secas são utilizadas como tempero devido seu odor perfumado e sabor agradável, altamente aromático, levemente acentuado e picante (Kokkini et al., 2003).

O óleo essencial de manjerona é composto por terpinen-4-ol,  $\alpha$ -terpineno,  $\gamma$ -terpineno,  $\alpha$ -terpineol e hidrato de cis-sabineno em quantidades variáveis (Kokkini et al., 2003).

O extrato bruto de *O. majorana* L mostrou resultados significativos contra microrganismos com inibição do crescimento de bactérias e fungos e na síntese de metabólitos microbianos (Busatta et al., 2008; Abdel-Massih & Abraham, 2014; Prakash et al., 2012). O óleo essencial ou o extrato de *O. majorana* L pode ser usado na prevenção de distúrbios do sistema nervoso central (El-Ashmawy et al., 2007; Rezaie et al., 2011), possui efeitos antioxidantes (Roby et al., 2013) e anticâncer (Dhaheri et al., 2013; Rao et al., 2014). O chá, por sua vez, demonstrou possuir propriedades imunoestimulantes, antígenotóxicas e antimutagênicas (Ramadan, El-Beih, & Zahra, 2012; Khan et al., 2013). Essas atividades são atribuídas à composição química, caracterizada com flavonóides e terpenóides (Vági et al., 2005).

### 1.4.1.3 *Origanum vulgare* L - Orégano



Fonte: <https://hortodidatico.ufsc.br/oregano/>

**Figura 3.** Folhas e flores de *Origanum vulgare* L (Orégano)

*Origanum vulgare* L, pertence à família Lamiaceae é uma herbácea perene, aromática, ereta, de hastes algumas vezes arroxeadas, medindo de 30- 50 cm de altura (Lorenzi & Matos, 2002) e de 75-90 cm de altura (Alonso, 2004). Folhas simples, esparso-pubescentes, de 1-2 cm de comprimento. Flores esbranquiçadas, róseas ou violáceas, dispostas em glomérulos e reunidos em inflorescências paniculadas terminais. Uma das ervas mais populares em todo o mundo. O seu cultivo em jardins e campos abertos é muito comum nos países do Mediterrâneo (Kokkini et al., 2003). Classificado pelo botânico Linnaeus em 1754 durante a *Tournefort*, na 5ª edição do *Genera Plantarum*, caracterizando-o como sendo uma labiada com flores mais ou menos em picos, brácteas conspícuas e muitas vezes coloridas e cálices com cinco dentes iguais (Letswaart, 1980 apud Linnaeus, 1754; Kintzios, 2002).

Conhecida por ser uma planta versátil, com várias propriedades terapêuticas e atividade antimicrobiana, vem sendo utilizada na medicina tradicional em muitos países. Suas folhas frescas e secas são usadas como aromatizante (Collin, 2006).

A ação antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial extraído do orégano é atribuída principalmente ao carvacrol e timol, diminuindo a formação de biofilme e o crescimento de alguns patógenos de origem alimentar e microrganismos deteriorantes

e da levedura *Cryptococcus neoformans* (Benavides et al., 2012; Nostro et al., 2007; Pelissari et al., 2009; Soni et al., 2013).

Estruturalmente, o carvacrol e o timol são fenóis isoméricos de monoterpenos e constituem ~ 78% do óleo essencial e ainda contém dois hidrocarbonetos monoterpenos,  $\gamma$ -terpineno e p-cimeno, que representam aproximadamente 5 e 7% do teor de fenol do óleo essencial de orégano, respectivamente (Adam et al., 1998).

#### 1.4.1.4 *Rosmarinus officinalis* L – Alecrim



Fonte: <http://florawww.eeb.uconn.edu/198501280.html>

**Figura 4.** Folhas e flores de *Rosmarinus officinalis* L (Alecrim)

*Rosmarinus officinalis* L, conhecido como alecrim, pertence à família Lamiaceae, é um subarbusto lenhoso, ereto, pouco ramificado, perene medindo cerca de 1,5 m de altura. Folhas com 1,3 – 4 cm de comprimento e 0,1 – 0,3 cm de largura, lanceolada, opostas cruzadas, sésseis simples, lineares, coriáceas, com margens recurvadas, face superior verde rugosa, face inferior esbranquiçada. Inflorescências axilares, do tipo racemo, flores azuladas, pequenas, cerca de 1 cm de comprimento (Collin, 2016). É tolerante à seca e pode ser colhido de três a quatro vezes por ano, cultivadas como plantas medicinais em diferentes áreas do mundo, como o Mediterrâneo, Ásia e América Latina (Alu'datt et al, 2018).

O óleo essencial tem demonstrado uma série de atividades biológicas significativas, como antioxidantes antiulcerogênicos, propriedades anticarcinogênicas,



antimicrobiana, antiobesidade, anti-inflamatório, antidiabético, diurético, antitrombótico, hepatoprotetor, alívio da fadiga muscular na traquéia e intestino, tratamento e a prevenção de asma brônquica, distúrbios espasmogênicos, aterosclerose, doenças isquêmicas do coração aterosclerose e tumores (Collin, 2016; Alu'datt et al, 2018). Os constituintes predominantes do óleo de alecrim são alfa-pineno, 1,8- cineol e cânfora (Alu'datt, 2018).

#### 1.4.1.5 *Salvia sclarea* L - Sálvia



Fonte [BRBotanicals/photos/a.438936796439049/1156383044694417/?type=3&\\_rdr](https://brbotanicals/photos/a.438936796439049/1156383044694417/?type=3&_rdr)

**Figura 5.** Folhas e flores de *Salvia sclarea* L (Salvia)

*Salvia sclarea* L é uma erva nativa do sul da Europa e é cultivada em todo o mundo, especialmente na região do Mediterrâneo e na Europa Central, bienal ou perene robusta, com até um metro de altura, com grandes folhas peludas verdes e roxas. Suas pequenas flores são azuis, brancas ou rosa.

Desde os tempos antigos, a *S.sclarea* L é uma das ervas dos países mediterrânicos mais apreciadas e amplamente utilizada em medicina e culinária (Durling et al., 2007), bem como em cosméticos, perfumaria e indústria farmacêutica (Kong et al., 2010 ).

Na aromaterapia, é um bom relaxante para o estresse, asma e problemas digestivos e menstruais, o óleo essencial é usado como antidepressivo, anti- séptico, antiespasmódico, carminativo e afrodisíaco e na culinária é amplamente utilizado em alimentos processados de todos os tipos, bem como em bebidas alcoólicas e refrigerantes (Lawless, 2002).

O óleo essencial dessa planta pode atuar como antimicrobiano e conservante contra a deterioração dos alimentos (Kozics et al., 2013). Apresenta atividade bacteriostática e bactericida (Haiying et al., 2015).

O componente mais abundante é o 1,8-cineol. No entanto, vários autores relataram variações significativas espécies-específicas (Ahmadi e Mirza, 1999; Cardilea et al., 2009; Akin et al., 2010; Farjam, 2012; Nadaf et al., 2012; Naser Moadeli et al., 2013).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar *in vitro* a atividade dos óleos essenciais de *Ocimum basilicum* L, *Origanum majorana* L, *Origanum vulgare* L, *Rosmarinus officinalis* L e *Salvia sclarea* L, bem como os compostos químicos do óleo essencial com a menor concentração fungicida mínima sobre isolados biológicos de *Candida albicans*.

### 2.2 Objetivos específicos

- ✚ Avaliar *in vitro* a atividade dos óleos essenciais de *O. basilicum* L, *O. majorana*, *O. vulgare*, *R. officinalis* e *S. sclarea* sobre isolados biológicos de *C. albicans*.
- ✚ Determinar as concentrações fungicidas mínimas dos óleos essenciais de *O. basilicum*, *O. majorana*, *O. vulgare*, *R. officinalis* e *S. sclarea* sobre *C. albicans*.
- ✚ Avaliar e comparar a formação de tubo germinativo e a produção de franjas, em isolados de *C. albicans* antes e após contato com os diferentes óleos essenciais.
- ✚ Avaliar e determinar *in vitro* as concentrações fungicidas mínimas dos compostos químicos do óleo essencial com a menor concentração fungicida mínima sobre *C. albicans*.
- ✚ Avaliar e comparar a formação de tubo germinativo e a produção de franjas, em isolados de *C. albicans* antes e após contato com os diferentes compostos químicos do óleo essencial com a menor concentração fungicida mínima sobre *C. albicans*.

### **3. MATERIAL E METODOS**

#### **3.1 Isolados Biológicos: *Candida albicans***

Foram utilizados 16 isolados de *C. albicans* desconhecidos quanto ao material biológico de onde foram isolados e mantidos em meio de cultura ágar Sabouraud Dextrose (Difco – USA) no Núcleo de Microscopia Eletrônica do Instituto Adolfo Lutz. Embora previamente identificadas como *C. albicans* estas foram reidentificadas utilizando-se as provas para pesquisa de tubo germinativo (teste de Reynolds – Braude) e clamidoconídeo em microcultivo em lâmina, descritos segundo a técnica de Kreger van Rij, 1984 e Kurtzmann & Fell, 2011.

#### **3.2 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 no microscópio de luz, antes e após contato com os óleos essenciais.

#### **3.3 Tipagem fenotípica**

A tipagem fenotípica foi avaliada antes e após contato com os óleos essenciais utilizando a técnica descrita por Phongpaichit et al., (1987) e Hunter & Fraser (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 48hs 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 & Fraser (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, e tipagem fenotípica foram realizadas nas concentrações sub-inibitórias de cada isolado de *C. albicans* testado. Como controle, isolados sem o contato com o óleo essencial foram avaliados simultaneamente.

### **3.4 Óleo essencial**

Os óleos essenciais de *Ocimum basilicum* L, *Origanum majorana* L, *Origanum vulgare* L, *Rosmarinus officinalis* L e *Salvia sclarea* L foram adquiridos da empresa Ferquima Ind. Com. Ltda. Esse fornecedor produz e comercializa óleos essenciais em escala industrial. Todos os óleos essenciais foram mantidos em frasco âmbar, à temperatura ambiente.

A pesquisa com os compostos químicos do óleo essencial com a menor concentração fungicida mínima sobre isolados biológicos de *Candida albicans* foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich®.

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

#### **3.5.1 Preparação da suspensão de leveduras**

Os isolados de *C. albicans* foram cultivados em ágar Sabouraud Dextrose (Difco –

USA) e incubados em estufa a 37°C por 24 horas. A suspensão dos isolados foi preparada 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 (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.

### **3.5.2 Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica dos óleos essenciais e compostos químicos.**

Para a pesquisa *in vitro* da atividade antifúngica dos óleos essenciais de manjerição, orégano, manjerona, alecrim e sálvia e compostos químicos, os ensaios foram realizados em microplacas, de fundo chato, com 96 poços e capacidade de 300 µL. Todos os ensaios foram realizados em duplicata. Foram colocados, em cada poço, 100 µL da solução de meio RPMI- 1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) acrescido do tensoativo polissorbato Tween 20 (Sigma- Aldrich®), até o 24º poço. Posteriormente, colocou-se no primeiro 200 µL do óleo essencial a ser testado. Realizou-se uma diluição seriada, na base dois até ao 24º poço. Em seguida, foi adicionado 100 µL da suspensão da levedura a cada poço. As placas foram seladas com Parafilm —MII®, sendo incubada em estufa a 37°C, por 24 horas.

### **3.6 Controles**

Em uma placa de microdiluição à parte foi realizado: 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 + inóculo). Esta placa foi tampada e incubada em estufa a 37°C, por 24 horas.

### **3.7 Determinação da concentração fungicida mínima**

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

A avaliação das atividades fungistática ou fungicida dos óleos essenciais e dos compostos químicos foi realizada em placas de Petri com ágar Sabouraud Dextrose

(DIFCO), semeando-se 5µl das diluições de cada poço para verificar a inibição do crescimento fúngico. As placas de Petri com os inóculos de cada poço da placa de microdiluição 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.

### **3.8 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 (OMS, 2004).

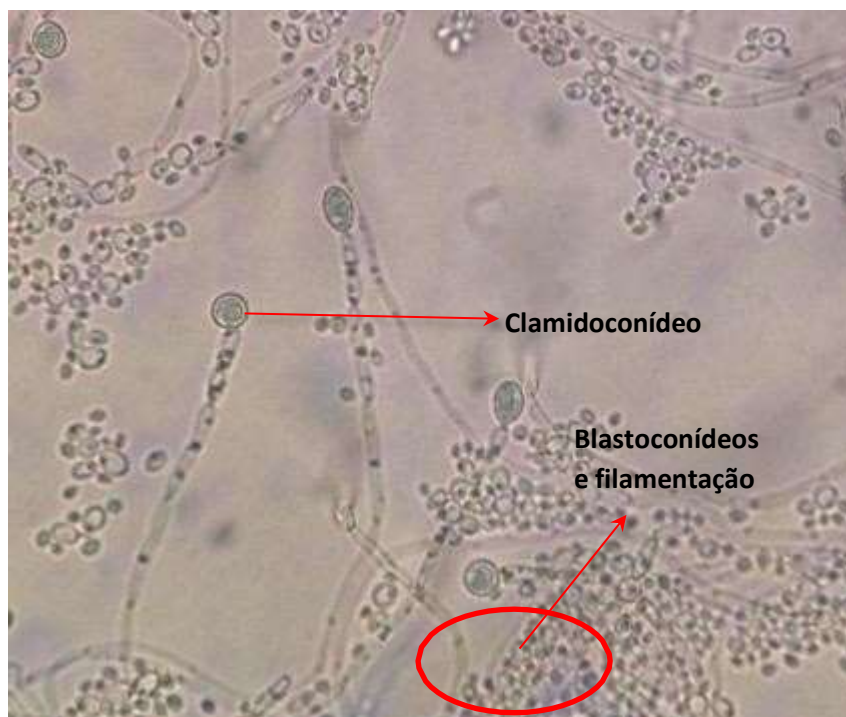
### **3.9 Descartes dos resíduos**

Todos os resíduos gerados das coletas e análises microbiológicas seguiram as normas de descarte estabelecidas pelo plano de gerenciamento de resíduos do Instituto Adolfo Lutz (Instituto Adolfo Lutz, 2002; Brasil, 2003).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 *Candida albicans*

Os 16 isolados utilizados nesta pesquisa foram reidentificados como *Candida albicans* e todos apresentaram tubo germinativo e clamidoconídeos antes do contato com os óleos essenciais.



**Micrografia 1.** Presença de clamidoconídeos, blastoconídeos, pseudohifas e hifas verdadeiras

### 4.2 Características dos óleos essenciais de *O. basilicum* L, *O. majorana* L, *O. vulgare* L, *R. officinalis* L e *S. sclarea* L.

#### 4.2.1 *Ocimum basilicum* L

O óleo essencial de *O. basilicum* utilizado nesta pesquisa é originário da Índia e obtido por meio da destilação a vapor das folhas, com coloração amarelo palha e odor característico. Os principais componentes são Metilchavicol (estragol) (85%); Eucaliptol (3%); Bergamoteno (2,7%); transo cimento (2%); Lilanol (0,8%) e Eugenol (0,6%) (Anexo 1).



#### **4.2.2 *Origanum majorana* L**

O óleo essencial de *O. majorana* utilizado nesta pesquisa é originário do Egito, e obtido por meio da destilação a vapor das folhas, com coloração amarelo palha e odor herbal, condimentado. Os principais componentes são Y-terpineno (13%); Sabineno (16%) e Terpineno-1-ol-4 (22%) (Anexo 2).

#### **4.2.3 *Origanum vulgare* L**

O óleo essencial de *O. vulgare* utilizado nesta pesquisa é originário da Moldávia e obtido por meio da destilação a vapor das folhas, com coloração amarelo claro e odor característico. Os principais componentes são Carvacrol (72%); Timol (2%); Y- terpineno (4,5%); Para-cimeno (4%) e Linalol (4%) (Anexo 3).

#### **4.2.4 *Rosmarinus officinalis* L**

O óleo essencial de *R. officinalis* utilizado nesta pesquisa é originário do Marrocos ou Tunísia e obtido por meio da destilação a vapor das folhas, com coloração amarelo palha e odor característico. Os principais componentes são

1.8 cineol (40%); Canfora (15%); Alfa pineno (13%); Beta pineno (7%) e Limoneno (3%) (Anexo 4).

#### **4.2.5 *Salvia sclarea* L**

O óleo essencial de *S. sclarea* utilizado nesta pesquisa é originário da França e obtido por meio da destilação a vapor das folhas, com coloração amarelo palha e odor herbal, doce e suave. Os principais componentes são Acetato de Linalinal (57%); Linalol (23%); Alfa terpinol (3%); Getmacreme D (2%) e Sclareol (2%) (Anexo 5).

#### **4.3 Atividade *in vitro* do óleo essencial de *O. basilicum* L sobre isolados de *C. albicans***

Na tabela 1 observa-se a atividade do óleo essencial de *O. basilicum* sobre isolados de *C. albicans*. O isolado de número 11 foi sensível até a concentração de 1,44µg/mL.

Os valores de CFM50 e CFM90, nos diferentes isolados foram 2,88µg/mL e 92,25µg/mL respectivamente (Tabela 6).

Em relação à média e o desvio padrão da CFM do óleo essencial de *O. basilicum* foi de  $15,40 \pm 30,09$ µg/mL. Os valores de Mínima e Máxima apresentados foram de 1,44 µg/mL e 92,25 µg/mL respectivamente (Tabela 7).

A pesquisa de tubo germinativo, após contato com o óleo essencial de *O. basilicum* na dose subinibitória foi realizada em todos os dezesseis isolados e em 31,25% (5/16) (12,13,14,15,16) dos isolados não apresentaram tubo germinativo (Tabela 1).

Morfologicamente, 93,75% (15/16) dos isolados apresentaram alteração nas colônias quanto a formação e tamanho das franjas em relação ao controle. Os isolados 1 e 12 (12,5%) (2/16) não apresentaram crescimento na placa após contato com o óleo essencial *O. basilicum* (Tabela 1).

**Tabela 1** Concentração Fungicida Mínima, formação de tubo germinativo e morfotipos de *Candida albicans* antes e após contato com o óleo essencial de *Ocimum basilicum* L.

<b>Ocimum basilicum</b>	<b>CFM</b>	<b>Tubo germinativo</b>		<b>Morfotipagem **</b>	
		<b>Antes da atividade do óleo essencial</b>	<b>Após a atividade do óleo essencial</b>	<b>Antes da atividade do óleo essencial</b>	<b>Após a atividade do óleo essencial</b>
<b>Isolados</b>	<b>µg/mL*</b>				
1	11,53	Presente	Presente	5341	SC***
2	5,76	Presente	Presente	5341	5341
3	2,88	Presente	Presente	7341	2238
4	5,76	Presente	Presente	5345	5541
5	2,88	Presente	Presente	7346	5241
6	5,76	Presente	Presente	7541	5541
7	5,76	Presente	Presente	5240	5341
8	92,25	Presente	Presente	1240	0006
9	2,88	Presente	Presente	7341	5241
10	2,88	Presente	Presente	5341	5546
11	1,44	Presente	Presente	5341	5240
12	92,25	Presente	Ausente	7241	SC
13	2,88	Presente	Ausente	1231	3341
14	5,76	Presente	Ausente	5541	7331
15	2,88	Presente	Ausente	5240	5630
16	2,88	Presente	Ausente	5246	5241

Condições do estudo: Pesquisa da concentração fungicida mínima CFM em placas de microdiluição com leitura em 24 horas. Pesquisa da atividade fungistática e fungicida em Ágar Sabouraud dextrose com leitura em 24 horas. Presença de crescimento (atividade fungistática) e ausência de crescimento (atividade fungicida). Resultados apresentados em µg/mL

\*CFM: concentração fungicida mínima

\*\*Código dos morfotipos de *Candida albicans* conforme modelo de Pongpachit, 1987- modificado por Hunter et al., 1989.

\*\*\* SC ausência de crescimento da colônia

#### **4.4 Atividade *in vitro* do óleo essencial de *O. majorana* L sobre isolados de *C. albicans***

Na tabela 2 observa-se a atividade do óleo essencial de *O. majorana* sobre isolados de *C. albicans*. O isolado de número 12 foi sensível até a concentração de 0,66µg/mL. Dentre os dezesseis isolados de *C. albicans*, 56,25% (9/16) (1, 2, 9, 10, 11, 13, 14, 15 e 16) foram sensíveis até a concentração de 1,32µg/mL.

Os valores de CFM50 e CFM90 foram 1,32µg/mL e 2,64µg/mL respectivamente (Tabela 6).

Em relação à média e o desvio padrão da CFM do óleo essencial de *O. majorana* foi de  $2,93 \pm 4,91\mu\text{g/mL}$ . Os valores de mínima e máxima foram de 0,66µg/mL e 21,18µg/mL respectivamente (Tabela 7).

A pesquisa de tubo germinativo, após contato com o óleo essencial de *O. majorana* na dose subinibitória foi realizada em todos os isolados. E 31,25% (5/16) dos isolados (10, 11, 12, 13 e 14) apresentaram tubo germinativo (Tabela 2).

O óleo essencial de *O. majorana* alterou morfológicamente 100% dos isolados testados e o isolado de número 4 não cresceu (Tabela 2).

**Tabela 2** Concentração Fungicida Mínima, formação de tubo germinativo e morfotipos de *Candida albicans* antes e após contato com o óleo essencial de *Origanum majorana* L.

Isolados	CFM µg/mL	Tubo germinativo		Morfo tipagem**	
		Antes da atividade do óleo essencial	Após a atividade do óleo essencial	Antes da atividade do óleo essencial	Após a atividade do óleo essencial
1	1,32	Presente	Ausente	5341	5241
2	1,32	Presente	Ausente	5341	7241
3	21,18	Presente	Ausente	7341	7338
4	2,64	Presente	Ausente	5345	SC***
5	2,64	Presente	Ausente	7346	5341
6	2,64	Presente	Ausente	7541	3001
7	2,64	Presente	Ausente	5240	2241
8	2,64	Presente	Ausente	1240	0001
9	1,32	Presente	Ausente	7341	0001
10	1,32	Presente	Presente	5341	7540
11	1,32	Presente	Presente	5341	1241
12	0,66	Presente	Presente	7241	7341
13	1,32	Presente	Presente	1231	2241
14	1,32	Presente	Presente	5541	5341
15	1,32	Presente	Ausente	5240	2340
16	1,32	Presente	Ausente	5246	7001

Condições do estudo: Pesquisa da concentração fungicida mínima CFM em placas de microdiluição com leitura em 24 horas. Pesquisa da atividade fungistática e fungicida em Ágar Sabouraud dextrose com leitura em 24 horas. Presença de crescimento (atividade fungistática) e ausência de crescimento (atividade fungicida). Resultados apresentados em µg/mL

\*CFM: concentração fungicida mínima

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

\*\*\* SC ausência de crescimento da colônia

#### **4.5 Atividade *in vitro* do óleo essencial de *O. vulgare* L sobre isolados de *C. albicans***

Na tabela 3 observa-se a atividade do óleo essencial de *O. vulgare* sobre isolados de *C. albicans*. Foram sensíveis, 12,50% dos isolados (2/16) (1 e 7), até a concentração de 0,18µg/mL e 37,50% (6/16) (3, 4, 6, 8, 9 e 11) foram sensíveis até a concentração de 1,5 µg/mL.

Os valores de CFM50 e CFM90 para o óleo essencial de *O. vulgare* nos diferentes isolados foram 0,75µg/mL e 1,5µg/mL respectivamente (Tabela 6).

Em relação à média e o desvio padrão foi de  $0,86 \pm 0,54\mu\text{g/mL}$ . Os valores de mínima e máxima foram de 0,18µg/mL e 1,5µg/mL respectivamente (Tabela 7).

A pesquisa de tubo germinativo, após contato com o óleo essencial na dose subinibitória, 18,75% (3/16) dos isolados mantiveram o tubo germinativo (tabela 3).

Alterações morfológicas ocorreram em 25% (4/16) dos isolados de *C. albicans*, em relação ao controle (1, 10, 12 e 14). Os demais isolados não apresentaram crescimento na placa (tabela 3).

**Tabela 3** Concentração Fungicida Mínima, formação de tubo germinativo e morfotipos de *Candida albicans* antes e após contato com o óleo essencial de *Origanum vulgare* L.

Isolados	CFM µg/mL	Tubo germinativo		Morfotipagem**	
		Antes da atividade do óleo essencial	Após a atividade do óleo essencial	Antes da atividade do óleo essencial	Após a atividade do óleo essencial
1	0,18	Presente	Ausente	5341	7248
2	0,75	Presente	Ausente	5341	SC***
3	1,5	Presente	Ausente	7341	SC
4	1,5	Presente	Ausente	5345	SC
5	0,37	Presente	Presente	7346	SC
6	1,5	Presente	Presente	7541	SC
7	0,18	Presente	Ausente	5240	SC
8	1,5	Presente	Presente	1240	SC
9	1,5	Presente	Ausente	7341	SC
10	0,75	Presente	Ausente	5341	5241
11	1,5	Presente	Ausente	5341	SC
12	0,75	Presente	Ausente	7241	1241
13	0,37	Presente	Ausente	1231	SC
14	0,37	Presente	Ausente	5541	7336
15	0,37	Presente	Ausente	5240	SC
16	0,75	Presente	Ausente	5246	SC

Condições do estudo: Pesquisa da concentração fungicida mínima CFM em placas de microdiluição com leitura em 24 horas. Pesquisa da atividade fungistática e fungicida em Ágar Sabouraud dextrose com leitura em 24 horas. Presença de crescimento (atividade fungistática) e ausência de crescimento (atividade fungicida). Resultados apresentados em µg/mL

\*CFM: concentração fungicida mínima

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

\*\*\* SC ausência de crescimento da colônia

#### **4.6 Atividade *in vitro* do óleo essencial de *R. officinalis* L sobre os isolados de *C. albicans***

Na tabela 4 observa-se a atividade do óleo essencial de *R. officinalis* sobre isolados de *C. albicans*. Foram sensíveis 12,50% dos isolados (2/16) (5 e 6), até a concentração de 1,26µg/mL e 37,50% (6/16), foram sensíveis até a concentração de 5,05µg/mL.

Os valores de CFM50 e CFM90 foram 5,05µg/mL e 80,85µg/mL respectivamente (Tabela 6).

Em relação à média e o desvio padrão da CFM foi de  $31,90 \pm 35,55\mu\text{g/mL}$ . Os valores de Mínima e Máxima apresentados foram de 1,26µg/mL e 80,85µg/mL respectivamente (Tabela 7).

A pesquisa de tubo germinativo foi realizada em todos os isolados após contato com o óleo essencial de *R. officinalis* na dose subinibitória, 12,50% (2/16) (5 e 6) apresentaram tubo germinativo (Tabela 4).

Morfologicamente, não foi possível observar alteração nas colônias quanto a formação e tamanho das franjas em relação ao controle, em 81,25% (13/16) devido a ausência de crescimento (Tabela 4).



**Tabela 4.** Concentração Fungicida Mínima, formação de tubo germinativo e morfotipos de *Candida albicans* antes e após contato com o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L

<i>Rosmarinus officinalis</i>	CFM	Tubo germinativo		Morfotipagem**	
Isolados	µg/mL *	Antes da atividade do óleo essencial	Após a atividade do óleo essencial	Antes da atividade do óleo essencial	Após a atividade do óleo essencial
1	2,52	Presente	Ausente	5341	0008
2	20,21	Presente	Ausente	5341	SC***
3	2,52	Presente	Ausente	7341	SC
4	5,05	Presente	Ausente	5345	SC
5	1,26	Presente	Presente	7346	0000
6	1,26	Presente	Presente	7541	5541
7	80,85	Presente	Ausente	5240	SC
8	20,21	Presente	Ausente	1240	SC
9	5,05	Presente	Ausente	7341	SC
10	80,85	Presente	Ausente	5341	SC
11	40,42	Presente	Ausente	5341	SC
12	80,85	Presente	Ausente	7241	SC
13	2,52	Presente	Ausente	1231	SC
14	80,85	Presente	Ausente	5541	SC
15	5,05	Presente	Ausente	5240	SC
16	80,85	Presente	Ausente	5246	SC

Condições do estudo: Pesquisa da concentração fungicida mínima CFM em placas de microdiluição com leitura em 24 horas. Pesquisa da atividade fungistática e fungicida em Ágar Sabouraud dextrose com leitura em 24 horas. Presença de crescimento (atividade fungistática) e ausência de crescimento (atividade fungicida). Resultados apresentados em µg/mL

\*CFM: concentração fungicida mínima

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

\*\*\* SC ausência de crescimento da colônia

#### **4.7 Atividade *in vitro* do óleo essencial de *S. sclarea* L sobre isolados de *C. albicans***

Na tabela 5 observa-se a atividade do óleo essencial de *S. sclarea* sobre isolados de *C. albicans*. Os isolados 1, 4 e 13 (18,75%) (3/16) foram sensíveis ao óleo essencial de *S. sclarea* L até a concentração de 1,37µg/mL e 31,25% (5/16) (3, 5, 8, 14 e 15) foram sensíveis até a concentração de 2,74µg/mL.

Os valores de CFM50 e CFM90 apresentados foram 2,74µg/mL e 21,93µg/mL respectivamente (Tabela 6).

Em relação à média e o desvio padrão da CFM do óleo essencial de *S. sclarea* foi de 17,22 ± 42,73µg/mL. Os valores de Mínima e Máxima apresentados foram de 1,37µg/mL e 175,5µg/mL respectivamente (Tabela 7).

A pesquisa de tubo germinativo, após contato com o óleo essencial de *S. sclarea* L na dose subinibitória foi realizada em todos os isolados, permanecendo esta estrutura, apenas no isolado número 1 (6,25%) (1/16) (Tabela 5).

Morfologicamente, ocorreram alterações quanto ao tamanho e distribuição de franjas em 37,5% (6/16) dos isolados em relação ao controle com (Tabela 5).

**Tabela 5.** Concentração Fungicida Mínima, formação de tubo germinativo e morfotipos de *Candida albicans* antes e após contato com o óleo essencial de *Salvia sclarea* L.

Isolados	CFM µg/mL *	Tubo germinativo		Morfotipagem**	
		Antes da atividade do óleo essencial	Após a atividade do óleo essencial	Antes da atividade do óleo essencial	Após a atividade do óleo essencial
1	1,37	Presente	Presente	5341	5231
2	5,48	Presente	Ausente	5341	5241
3	2,74	Presente	Ausente	7341	5341
4	1,37	Presente	Ausente	5345	7340
5	2,74	Presente	Ausente	7346	0000
6	5,48	Presente	Ausente	7541	0000
7	10,96	Presente	Ausente	5240	0000
8	2,74	Presente	Ausente	1240	0000
9	175,5	Presente	Ausente	7341	0001
10	21,93	Presente	Ausente	5341	0000
11	21,93	Presente	Ausente	5341	0000
12	10,96	Presente	Ausente	7241	0000
13	1,37	Presente	Ausente	1231	1240
14	2,74	Presente	Ausente	5541	0000
15	2,74	Presente	Ausente	5240	3240
16	5,48	Presente	Ausente	5246	0000

Condições do estudo: Pesquisa da concentração fungicida mínima CFM em placas de microdiluição com leitura em 24 horas. Pesquisa da atividade fungistática e fungicida em Ágar Sabouraud dextrose com leitura em 24 horas. Presença de crescimento (atividade fungistática) e ausência de crescimento (atividade fungicida). Resultados apresentados em µg/mL

\*CFM: concentração fungicida mínima

\*\*Código dos morfotipos de *Candida albicans* conforme modelo de Pongpachit, 1987-modificado por Hunter et al., 1989.

**Tabela 6.** Valores de CFM50 e CFM90 dos óleos essenciais de *Ocimum basilicum* L, *Origanum majorana* L, *Origanum vulgare* L, *Rosmarinus officinalis* L e *Salvia sclarea* L sobre isolados de *Candida albicans* de origem humana.

Óleos essenciais	CFM 50* µg/mL	CFM 90** µg/mL
<i>Ocimum basilicum</i> L	2,88	92,25
<i>Origanum majorana</i> L	1,32	2,64
<i>Origanum vulgare</i> L	0,75	1,5
<i>Rosmarinus officinalis</i> L	5,05	80,85
<i>Salvia sclarea</i> L	2,74	21,93

Condições do estudo: Pesquisa da Concentração fungicida mínima CFM em placas de microdiluição e leitura em 24 horas: resultado em mg/mL

**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.

**Tabela 7.** Média, desvio padrão, máxima e mínima dos óleos essenciais de *Ocimum basilicum* L, *Origanum majorana* L, *Origanum vulgare* L, *Rosmarinus officinalis* L e *Salvia sclarea* L. sobre isolados de *Candida albicans* de origem humana.

VARIAVEL – CFM*	<i>C.albicans</i>
<i>Ocimum basilicum</i> L	N=16
$\mu \pm dp^{**}$	15,40 $\pm$ 30,09 $\mu$ g/mL
Min.– Max.***	1,44 $\mu$ g/mL e 92,25 $\mu$ g/mL
VARIAVEL – CFM*	<i>C.albicans</i>
<i>Origanum majorana</i> L	N=16
$\mu \pm dp^{**}$	2,93 $\pm$ 4,91 $\mu$ g/mL
Min.– Max.***	0,66 $\mu$ g/mL e 21,18 $\mu$ g/mL
VARIAVEL – CFM*	<i>C.albicans</i>
<i>Origanum vulgare</i> L	N=16
$\mu \pm dp^{**}$	0,86 $\pm$ 0,54 $\mu$ g/mL
Min.– Max.***	0,18 $\mu$ g/mL e 1,5 $\mu$ g/mL
VARIAVEL – CFM*	<i>C.albicans</i>
, <i>Rosmarinus officinalis</i> L	N=16
$\mu \pm dp^{**}$	31,90 $\pm$ 35,55 $\mu$ g/mL
Min.– Max.***	1,26 $\mu$ g/mL e 80,85 $\mu$ g/mL
VARIAVEL – CFM*	<i>C.albicans</i>
<i>Salvia sclarea</i> L	N=16
$\mu \pm dp^{**}$	17,22 $\pm$ 42,73 $\mu$ g/mL
Min.– Max.***	1,37 $\mu$ g/mL e 175,5 $\mu$ g/mL

Condições do estudo: Pesquisa da concentração inibitória mínima (CIM) em placas de microdiluição e leitura em 24 horas: resultado em  $\mu$ g/mL

\*Concentração fungicida mínima (CFM), pesquisa da atividade fungicida em Ágar Sabouraud dextrose, leitura em 24 horas:

\*\* $\mu \pm dp$  – Média e desvio padrão

\*\*\*Min. – Mínima e Max. Máxima .

Dentre os óleos essenciais testados o óleo essencial de *O. vulgare* apresentou a menor concentração fungicida sobre os isolados de *C. albicans* (Tabela 6), para tanto passa-se a apresentar a concentração fungicida mínima de cada composto químico: Carvacrol (72%);  $\gamma$ -terpineno (4,5%); P-cimeno (4%) e Linalol (4%) Timol (2%), desse óleo essencial sobre os isolados de *C.albcans*, a formação de tubo germinativo e a produção de franjas.

#### **4.8 Atividade *in vitro* do composto químico carvacrol do óleo essencial de *O. vulgare* L sobre isolados de *C. albicans***

Na tabela 8 observa-se a atividade do composto químico carvacrol do óleo essencial de *O. vulgare* sobre isolados de *C. albicans*. Foram sensíveis ao carvacrol 31,25% dos isolados (5/16); até a concentração de 0,087 $\mu$ g/mL, 25% (4/16) e até a concentração de 0,69 $\mu$ g/mL 31,25% (5/16) dos isolados.

Os valores de CFM50 e CFM90 para o carvacrol nos diferentes isolados foram 0,043 $\mu$ g/mL e 0,69 $\mu$ g/mL respectivamente (Tabela 13).

Em relação à média e o desvio padrão foi de  $7,18 \pm 22,59\mu\text{g/mL}$ . Os valores de mínima e máxima foram de 0,0021 $\mu$ g/mL e 89,35 $\mu$ g/mL respectivamente (Tabela 14).

A pesquisa de tubo germinativo, após contato com o composto químico carvacrol na dose subinibitória e em 100% (16/16) dos isolados a formação de tubo germinativo foi inibida (Tabela 8).

Alterações morfológicas ocorreram em 100% (16/16) dos isolados com inibição da produção de franjas (tabela 8).

**Tabela 8** Concentração Fungicida Mínima, formação de tubo germinativo e morfotipos sobre *Candida albicans* antes e após contato com o composto químico carvacrol do óleo essencial de *Origanum vulgare L.*

Carvacrol	CFM	Tubo germinativo		Morfotipagem**	
		Antes da atividade do óleo essencial	Após a atividade do óleo essencial	Antes da atividade do óleo essencial	Após a atividade do óleo essencial
Isolados	µg/mL *				
1	S***	Presente	Ausente	5341	0000
2	0,34	Presente	Ausente	5341	0001
3	0,69	Presente	Ausente	7341	0000
4	0,043	Presente	Ausente	5345	0001
5	22,33	Presente	Ausente	7346	0001
6	0,69	Presente	Ausente	7541	0001
7	S	Presente	Ausente	5240	0001
8	0,69	Presente	Ausente	1240	0001
9	89,35	Presente	Ausente	7341	0000
10	0,087	Presente	Ausente	5341	0000
11	0,043	Presente	Ausente	5341	0000
12	S	Presente	Ausente	7241	0000
13	0,69	Presente	Ausente	1231	0000
14	S	Presente	Ausente	5541	0001
15	S	Presente	Ausente	5240	0001
16	0,087	Presente	Ausente	5246	0000

Condições do estudo: Pesquisa da concentração fungicida mínima CFM em placas de microdiluição com leitura em 24 horas. Pesquisa da atividade fungistática e fungicida em Ágar Sabouraud dextrose com leitura em 24 horas. Presença de crescimento (atividade fungistática) e ausência de crescimento (atividade fungicida). Resultados apresentados em µg/mL

\*CFM: concentração fungicida mínima

\*\*Código dos morfotipos de *Candida albicans* conforme modelo de Pongpachit, 1987-modificado por Hunter et al., 1989.

\*\*\* S – Sensível (ausência de crescimento até a concentração de 0,0021 µg/mL)

#### **4.9 Atividade do composto químico $\gamma$ -terpineno do óleo essencial de *O. vulgare* L sobre isolados de *C. albicans***

Na tabela 9 observa-se a atividade do composto químico  $\gamma$ -terpineno do óleo essencial de *O. vulgare* sobre isolados de *C. albicans*. Foram sensíveis, 12,50% dos isolados (2/16) (9 e 12), até a concentração de 793,35 $\mu$ g/mL.

Os valores de CFM50 e CFM90 para o óleo essencial de *O. vulgare* nos diferentes isolados foram 3.173 $\mu$ g/mL e 12.693 $\mu$ g/mL respectivamente (Tabela 13).

Em relação à média e o desvio padrão foi de 13.439,98  $\pm$  25.590,53 $\mu$ g/mL. Os valores de mínima e máxima foram de 0,000005 $\mu$ g/mL e 101.550 $\mu$ g/mL respectivamente (Tabela 14).

A pesquisa de tubo germinativo, após contato com o composto químico carvacrol na dose subinibitória em 100% (16/16) dos isolados a formação de tubo germinativo foi inibida (Tabela 9).

Alterações morfológicas ocorreram em 31,25% (5/16) dos isolados de *C. albicans*, em relação ao controle com inibição da produção de franjas (2, 8, 13, 14 e 16) (Tabela 9).



**Tabela 9** Concentração Fungicida Mínima, formação de tubo germinativo e morfotipos sobre *Candida albicans* antes e após contato com o composto químico Y- terpineno do óleo essencial de *Origanum vulgare L.*

Y- terpineno	CFM	Tubo germinativo		Morfotipagem**	
		Antes da atividade do óleo essencial	Após a atividade do óleo essencial	Antes da atividade do óleo essencial	Após a atividade do óleo essencial
Isolados	µg/mL *				
1	12693	Presente	Ausente	5341	1241
2	6346	Presente	Ausente	5341	0000
3	3173	Presente	Ausente	7341	5541
4	3173	Presente	Ausente	5345	1340
5	1586	Presente	Ausente	7346	5341
6	3173	Presente	Ausente	7541	3240
7	50775	Presente	Ausente	5240	1240
8	101550	Presente	Ausente	1240	0000
9	793,35	Presente	Ausente	7341	5241
10	12693	Presente	Ausente	5341	1241
11	6346	Presente	Ausente	5341	1341
12	793,35	Presente	Ausente	7241	5341
13	12693	Presente	Ausente	1231	0001
14	3173	Presente	Ausente	5541	0000
15	6346	Presente	Ausente	5240	5241
16	3173	Presente	Ausente	5246	0000

Condições do estudo: Pesquisa da concentração fungicida mínima CFM em placas de microdiluição com leitura em 24 horas. Pesquisa da atividade fungistática e fungicida em Ágar Sabouraud dextrose com leitura em 24 horas. Presença de crescimento (atividade fungistática) e ausência de crescimento (atividade fungicida). Resultados apresentados em µg/mL

\*CFM: concentração fungicida mínima

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

#### **4.10 Atividade do composto químico linalol do óleo essencial de *O. vulgare* L sobre isolados de *C. albicans***

Na tabela 10 observa-se a atividade do composto químico linalol do óleo essencial de *O. vulgare* sobre isolados de *C. albicans*. O isolado de número 14 foi sensível até a concentração de 196,38µg/mL.

Os valores de CFM50 e CFM90 para o óleo essencial de *O. vulgare* nos diferentes isolados foram 785,54µg/mL e 12.137µg/mL respectivamente (Tabela 13).

Em relação à média e o desvio padrão foi de 4482,04 ± 6667,98µg/mL. Os valores de mínima e máxima foram de 196,38µg/mL e 25137µg/mL respectivamente (Tabela 14).

A pesquisa de tubo germinativo, após contato com o composto químico carvacrol na dose subinibitória e em 100% (16/16) dos isolados a formação de tubo germinativo foi inibida (Tabela 10).

Alterações morfológicas ocorreram em 75% (12/16) dos isolados de *C. albicans*, em relação ao controle com inibição da produção de franjas (Tabela 10).

**Tabela 10** Concentração Fungicida Mínima, formação de tubo germinativo e morfotipos sobre *Candida albicans* antes e após contato com o composto químico linalol do óleo essencial de *Origanum vulgare L.*

Linalol	CFM	Tubo germinativo		Morfotipagem**	
		Antes da atividade do óleo essencial	Após a atividade do óleo essencial	Antes da atividade do óleo essencial	Após a atividade do óleo essencial
Isolados	µg/mL *				
1	12568	Presente	Ausente	5341	0000
2	6284	Presente	Ausente	5341	0001
3	785,54	Presente	Ausente	7341	0001
4	392,77	Presente	Ausente	5345	0001
5	785,54	Presente	Ausente	7346	1241
6	12568	Presente	Ausente	7541	0001
7	785,54	Presente	Ausente	5240	0001
8	25137	Presente	Ausente	1240	0001
9	785,54	Presente	Ausente	7341	1241
10	1571	Presente	Ausente	5341	0000
11	3142	Presente	Ausente	5341	0000
12	3142	Presente	Ausente	7241	0000
13	785,54	Presente	Ausente	1231	0000
14	196,38	Presente	Ausente	5541	5241
15	6284	Presente	Ausente	5240	5241
16	785,54	Presente	Ausente	5246	0000

Condições do estudo: Pesquisa da concentração fungicida mínima CFM em placas de microdiluição com leitura em 24 horas. Pesquisa da atividade fungistática e fungicida em Ágar Sabouraud dextrose com leitura em 24 horas. Presença de crescimento (atividade fungistática) e ausência de crescimento (atividade fungicida). Resultados apresentados em µg/mL

\*CFM: concentração fungicida mínima

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

#### 4.11 Atividade do composto químico p-cinemo do óleo essencial de *O. vulgare* L sobre isolados de *C. albicans*

Na tabela 11 observa-se a atividade do composto químico p-cinemo do óleo essencial de *O. vulgare* sobre isolados de *C. albicans*. Foram resistentes 100% (16/16) dos isolados.

Na pesquisa de tubo germinativo, 100% (16/16) dos isolados mantiveram a formação dessa estrutura (Tabela 11).

Alterações morfológicas com relação a produção de franjas foram pouco representativas (Tabela 11).

**Tabela 11** Concentração Fungicida Mínima, formação de tubo germinativo e morfotipos sobre *Candida albicans* antes e após contato com o composto químico p- cinemo do óleo essencial de *Origanum vulgare* L.

P- cinemo	CFM	Tubo germinativo		Morfotipagem**	
		Antes da atividade do óleo essencial	Após a atividade do óleo essencial	Antes da atividade do óleo essencial	Após a atividade do óleo essencial
Isolados	µg/mL *				
1	R***	Presente	Presente	5341	7545
2	R	Presente	Presente	5341	5540
3	R	Presente	Presente	7341	5541
4	R	Presente	Presente	5345	5341
5	R	Presente	Presente	7346	7541
6	R	Presente	Presente	7541	5541
7	R	Presente	Presente	5240	7540
8	R	Presente	Presente	1240	1240
9	R	Presente	Presente	7341	5541
10	R	Presente	Presente	5341	5541
11	R	Presente	Presente	5341	5541
12	R	Presente	Presente	7241	7541
13	R	Presente	Presente	1231	3540
14	R	Presente	Presente	5541	7540
15	R	Presente	Presente	5240	5241
16	R	Presente	Presente	5246	5341

Condições do estudo: Pesquisa da concentração fungicida mínima CFM em placas de microdiluição com leitura em 24 horas. Pesquisa da atividade fungistática e fungicida em Ágar Sabouraud dextrose com leitura em 24 horas. Presença de crescimento (atividade fungistática) e ausência de crescimento (atividade fungicida). Resultados apresentados em µg/mL

\*CFM: concentração fungicida mínima

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

\*\*\*R – Resistente desde a concentração de 208.200 µg/mL

#### **4.12 Atividade do composto químico timol do óleo essencial de *O. vulgare* L sobre isolados de *C. albicans***

Na tabela 12 observa-se a atividade do composto químico timol do óleo essencial de *O. vulgare* L sobre isolados de *C. albicans*. Foram sensíveis, 12,50% dos isolados (2/16) (1 e 4), até a concentração de 11,74µg/mL e 18,75% (3/16) (3, 5 e 14) foram sensíveis até a concentração de 23,49µg/mL .

Os valores de CFM50 e CFM90 para o óleo essencial de *O. vulgare* nos diferentes isolados foram 46,99µg/mL e 93,99µg/mL respectivamente (Tabela 13).

Em relação à média e o desvio padrão foi de 67,72 ± 57,18µg/mL. Os valores de mínima e máxima foram de 11,74µg/mL e 187,98µg/mL respectivamente (Tabela 14).

A pesquisa de tubo germinativo, após contato com o composto químico carvacrol na dose subinibitória e em 100% (16/16) dos isolados a formação de tubo germinativo foi inibida (Tabela 12).

Alterações morfológicas ocorreram em 62,50% (10/16) dos isolados de *C. albicans*, em relação ao controle com inibição da produção de franjas (Tabela 12).

**Tabela 12** Concentração Fungicida Mínima, formação de tubo germinativo e morfotipos sobre *Candida albicans* antes e após contato com o composto químico timol do óleo essencial de *Origanum vulgare L.*

Isolados	Timol	CFM µg/mL *	Tubo germinativo		Morfotipagem**	
			Antes da atividade do óleo essencial	Após a atividade do óleo essencial	Antes da atividade do óleo essencial	Após a atividade do óleo essencial
1		11,74	Presente	Ausente	5341	5341
2		46,99	Presente	Ausente	5341	0001
3		23,49	Presente	Ausente	7341	0000
4		11,74	Presente	Ausente	5345	5241
5		23,49	Presente	Ausente	7346	5241
6		93,99	Presente	Ausente	7541	0001
7		46,99	Presente	Ausente	5240	0000
8		93,99	Presente	Ausente	1240	0000
9		93,99	Presente	Ausente	7341	0001
10		93,99	Presente	Ausente	5341	0001
11		93,99	Presente	Ausente	5341	0000
12		93,99	Presente	Ausente	7241	0000
13		187,98	Presente	Ausente	1231	1231
14		23,49	Presente	Ausente	5541	5531
15		93,99	Presente	Ausente	5240	0000
16		46,99	Presente	Ausente	5246	5246

Condições do estudo: Pesquisa da concentração fungicida mínima CFM em placas de microdiluição com leitura em 24 horas. Pesquisa da atividade fungistática e fungicida em Ágar Sabouraud dextrose com leitura em 24 horas. Presença de crescimento (atividade fungistática) e ausência de crescimento (atividade fungicida). Resultados apresentados em µg/mL

\*CFM: concentração fungicida mínima

\*\*Código dos morfotipos de *Candida albicans* conforme modelo de Pongpachit, 1987- modificado por Hunter et al., 1989.

**Tabela 13.** Valores de CFM50 e CFM90 dos compostos químicos Carvacrol; Y- terpineno; Para-cimeno; Linalol e Timol; do óleo essencial de *Origanum vulgare* L, sobre isolados de *C. albicans* de origem humana.

Óleos essenciais	CFM 50* µg/mL	CFM 90** µg/mL
Carvacrol	0,043	0,69
Y- terpineno	3.173	12.693
Linalol	785,54	12137
P-cimeno	208.200	208.200
Timol	46,99	93,99

Condições do estudo: Pesquisa da Concentração fungicida mínima CFM em placas de microdiluição e leitura em 24 horas: resultado em mg/mL

**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.

**Tabela 14** Média, desvio padrão, máxima e mínima dos compostos químicos Carvacrol;  $\gamma$ -terpineno; Para-cimeno; Linalol e Timol; do óleo essencial de *Origanum vulgare* L, sobre isolados de *C. albicans* de origem humana.

VARIAVEL – CFM*	<i>C.albicans</i>
<i>Carvacrol</i>	N=16
$\mu \pm dp^{**}$	7,18 $\pm$ 22,59 $\mu$ g/mL
Min.– Max.***	0,0021 $\mu$ g/mL e 89,35 $\mu$ g/mL
VARIAVEL – CFM*	<i>C.albicans</i>
<i><math>\gamma</math>-terpineno</i>	N=16
$\mu \pm dp^{**}$	13.439,98 $\pm$ 25.590,53 $\mu$ g/mL
Min.– Max.***	0,000005 $\mu$ g/mL e 101.550 $\mu$ g/mL
VARIAVEL – CFM*	<i>C.albicans</i>
<i>P-Cimeno</i>	N=16
$\mu \pm dp^{**}$	208.200 $\mu$ g/mL
Min.– Max.***	208.200 $\mu$ g/mL
VARIAVEL – CFM*	<i>C.albicans</i>
Linalol	N=16
$\mu \pm dp^{**}$	4482,04 $\pm$ 6667,98 $\mu$ g/mL
Min.– Max.***	196,38 $\mu$ g/mL e 25137 $\mu$ g/mL
VARIAVEL – CFM*	<i>C.albicans</i>
<i>Timol</i>	N=16
$\mu \pm dp^{**}$	67,72 $\pm$ 57,18 $\mu$ g/mL
Min.– Max.***	11.74 $\mu$ g/mL e 187,98 $\mu$ g/mL

Condições do estudo: Pesquisa da concentração inibitória mínima (CIM) em placas de microdiluição e leitura em 24 horas: resultado em  $\mu$ g/mL

\*Concentração fungicida mínima (CFM), pesquisa da atividade fungicida em Ágar Sabouraud dextrose, leitura em 24 horas:

\*\* $\mu \pm dp$  – Média e desvio padrão

\*\*\*Min. – Mínima e Max. Máxima .



## 5. DISCUSSÃO

*Candida albicans* é responsável por mais de 90% dos casos de infecção fúngica (Kauffman, 2006; Niu et al., 2017; Patil et al., 2017). A candidíase pode ser cutânea e em casos mais graves pode tornar-se invasiva e disseminar-se pela circulação sanguínea e sistema linfático, alcançando o esôfago, o sistema gastrointestinal, urinário, o fígado, os pulmões e também o sistema nervoso central (Araújo et al., 2012; Tortora et al., 2017). Pode também promover significativos quadros clínicos de candidíase, em pacientes transplantados, com neoplasias, acometidos pelo vírus HIV, diabéticos entre outros (Carvalho, 2004; Carvalho et al., 2010).

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; Furlaneto-Maia L et al., 2008; Jacobsen et al., 2012; Huang, 2012; Orsonio, Dora & Ponce, 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 & 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 (Pires et al., 2001; Huang, 2012; Mayer, Wilson & Hube, 2013).

A formação do tubo germinativo observada em espécies do gênero *Candida*, como *C. albicans* resulta na pseudohifa e hifa verdadeira o que 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 em processos infecciosos (Fidel e Sobel, 1996; Chaffin et al., 1998).

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, Phongpaichit 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 & Fraser (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 et al., (2003), observaram 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.

Nesta pesquisa foram estudados 16 isolados biológicos de *C. albicans* de origem humana, desconhecidos quanto ao material biológico de onde foram isolados e mantidos em meio de cultura ágar Sabouraud Dextrose (Difco – USA) no Núcleo de Microscopia Eletrônica do Instituto Adolfo Lutz. Na reidentificação todos os isolados apresentaram tubo germinativo e baseando-se especialmente nas diferenças de produção e extensão de franjas das colônias, nesta pesquisa obtêve-se morfotipos com franjas contínuas com filamentos paralelos (7) e morfotipos com franjas contínuas, somente na periferia ou fios conspícuos em leques (5) e Descontínua (>20% da margem) (1) e com comprimento igual ou menor do que 2mm (2) e com 3 a 5 mm (3); Igual ou maior do que 6 mm (5).

Vários estudos vêm apontando importantes propriedades terapêuticas de óleos essenciais de plantas sobre as leveduras patogênicas (Viollon & Chaumont, 1994; Carmo et al., 1998; Alves et al., 2000; Araujo et al., 2004; Lemos et al., 2004; Araujo et al., 2009; Coutinho et al., 2009; Lee et al., 2009; Zapata et al., 2010, Yaya et al., 2011, Oliveira et al., 2011; Zuzarte et al., 2011; Araújo, 2014; e Santos, 2016).

Os óleos essenciais constituem os elementos voláteis presentes em diferentes órgãos da planta e estão relacionados com diferentes funções necessárias à sobrevivência do vegetal, com composição química complexa, destacando-se a presença de terpenos e fenilpropanóides (Oliveira et al., 2006; Silva et al., 2003). Bhavanani & Ballou (1992), relataram que cerca de 60% dos óleos essenciais possuem propriedades antifúngicas. Esses compostos químicos têm origem no metabolismo secundário das espécies vegetais e são uma rica fonte de compostos biologicamente ativos. Conhecidos desde a antiguidade pode ser uma alternativa valiosa contra os mecanismos de resistência que inativam antifúngicos usuais e representar uma nova ferramenta fitoterápica no combate aos agentes infecciosos (Silva, Paula & Espindola, 2009; Castro, 2010; Saad et al., 2010; Khan, Malik & Ahmad, 2012).

Os óleos essenciais são hidrofóbicos, o que permite interação com estruturas lipídicas, aumentando a permeabilidade celular, provocando danos irreversíveis à célula (Nascimento et al., 2007).

Diferentes graus de atividades antimicrobianas estão relacionada ao patógeno, mas também dependem das espécies vegetais, como condições climáticas, o método de cultivo, método de preparação do óleo essencial e a composição química (Dhifi et al., 2016), alteração dos compostos, sejam por fatores genéticos, técnicos bióticos ou abióticos podem influenciar na qualidade do resultado de pesquisa e tratamentos (Morais, 2009). Outros fatores que podem influenciar na pesquisa são as várias metodologias para detecção da concentração inibitórias mínima dos óleos essenciais frente às leveduras (Araújo, 2014). A escolha pelo método de microdiluição em caldo para esta pesquisa deveu-se ao fato deste ser mais sensível em comparação aos outros apresentados na literatura, boa reprodutividade, baixo custo, ausência da necessidade de equipamentos complexos para leitura, além de requerer pequena quantidade de OEs (Ostrosky et al., 2008).

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. Esses agentes auxiliam na visualização dos resultados da atividade antimicrobiana dos óleos; porém, podem acarretar possíveis interações com a substância testada, bem como produzem atividade antimicrobiana (Nascimento et al., 2007)

Toledo (2013) utilizou os tensoativos *Tween 20* (polissorbato 20) e *Tween 80* (polissorbato 80), sobre cepas padrão de *C. albicans*, ambos não apresentaram atividade fungicida e fungistática. Já com o uso do solvente DMSO o resultado foi de uma atividade fungicida a 25% v/v (2.500 µg/mL). Uma vez que não se observou diferenças dos tensoativos, optou-se pelo tensoativo *Tween 20* para todos os ensaios, uma vez que possui a menor concentração, fácil homogeneização no meio de cultura e por não apresentar atividade fungicida. Nascimento et al., (2007) recomendaram a utilização do *Tween 20* a 0,02% como emulsificador para os testes com óleo essencial.

O trabalho de Al-Maskri et al., (2011) apresentou alterações em alguns compostos do óleo essencial de *Ocimum basilicum* entre o inverno e o verão. O óleo essencial no verão tem significativamente mais linalol, p-alilanol e β-farneseno e, ao mesmo tempo, muito menos conteúdo de limoneno e 1,8-cineol, mostrando uma variação sazonal na composição química diretamente relacionada a outras atividades antifúngicas. Foi

particularmente evidente na atividade contra o *Aspergillus niger*, que foi menor no verão. A concentração inibitória mínima do óleo essencial no inverno foi acima de 50 µg/mL, enquanto no verão foi maior que 100 µg/mL.

Além disso, muitos outros fatores podem afetar a atividade antimicrobiana, como quantidade e concentração de inóculo, tipo de meio de cultura, pH do meio e tempo de incubação. Todos esses fatores podem afetar o valor da CIM (Shi et al., 2019).

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 e com resultados de atividades biológicas confiáveis.

Os óleos essenciais estudados nesse trabalho foram *O. basilicum*, *O. majorana*, *O. vulgare*, *R. officinalis* e *S. sclarea*, todos da família Lamiaceae e que apresentaram atividade antimicrobiana significativa sobre os isolados de *C. albicans*.

Quanto à formação de tubos germinativos todos os isolados apresentaram esta estrutura antes do contato com os óleos essenciais, no entanto a formação foi inibida, em mais de 80% dos isolados de *C. albicans*, após contato com os óleos essenciais, nas doses subinibitórias, especialmente frente ao óleo essencial de *O. vulgare*, *R. officinalis* e *S. sclarea*.

Gauch et al., (2014) encontraram inibição na formação de tubo germinativo em 100% das amostras de *C. albicans* em contato com o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L, na concentração de 4%. Sadowska, et al., (2014) relatou pela primeira vez um importante potencial antifúngico das saponinas obtidos de partes aéreas e raízes de *M. sativa* e raízes de *S. officinalis* utilizadas isoladamente ou em conjunto com antimicóticos. Como exemplo apresentou uma eficácia sinérgica, *in vitro*, com uso em conjunto com a Nistatina (Rosato et al., 2009). São capazes de inibir a formação de tubos germinativos, limitar o crescimento das hifas, reduzir a aderência de leveduras, a formação de biofilme e erradicação de biofilme maduro de *Candida* em 24 horas. Além disso, a *M. sativa*, obtida principalmente de partes aéreas e apresentou baixa citotoxicidade contra a linha de fibroblastos de camundongo L929.

Uma forma de avaliar a capacidade de virulência é baseando-se nas diferenças de produção e extensão de franjas das colônias. Neste trabalho, nas doses subinibitórias, após contato com os óleos essenciais de *O. vulgare*, *R. officinalis* e *S. sclarea* alteraram em mais de 70% dos isolados a produção de franjas. 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., (1992) e Giammanco et al., (2005) também relataram 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, tal fenômeno pode ser a explicação para as alterações observadas na morfologia das colônias, após contato com os óleos essenciais.

Karpinski (2020) em revisão apresentou atividade antifúngica de 72 plantas da família Lamiaceae. Mais da metade delas apresentou atividade contra fungos com concentrações inibitórias mínimas (CIM) de <1000 µg/mL. Os compostos químicos principais e mais comumente encontrados incluem β- cariofileno (41 plantas), linalol (27 plantas), limoneno (26), β-pineno (25), 1,8-cineol (22), carvacrol (21), α-pineno (21), p-cimeno (20), γ-terpineno (20) e timol (20). Segundo Sautour (2004) atividade antimicrobiana é significativa quando os resultados atingem valores < 200 µg/mL para compostos químicos isolados.

A família Lamiaceae possui plantas medicinais valiosas, ricas em óleos essenciais de grande valor em medicina natural, farmacologia, cosmetologia e aromaterapia (Ramasubramania, 2012). Os óleos essenciais estão presentes em diferentes partes da planta principalmente nas folhas, mas também podem ser encontrados em flores, brotos, frutas, sementes, casca, madeira ou raízes (Carović-Stanko et al., 2016). Existem 236 gêneros e entre 6.900 e 7.200 espécies, sendo as mais abundantes pertencem à *Salvia* (900 espécies), seguido de *Scutellaria* (360), *Stachys* (300), *Plectranthus* (300), *Hyptis* (280), *Teucrium* (250), *Vitex* (250), *Thymus* (220) e *Nepeta* (200) (Ramasubramania, 2012). Entre os compostos ativos dos óleos essenciais estão várias classes químicas como álcoois, éteres, aldeídos, cetonas, ésteres, fenóis, terpenos (monoterpenos, sesquiterpenos) e cumarinas (Piątkowska & Rusiecka-Ziółkowska, 2016; Dhifi, 2016).

Segundo Bona et al., (2016) os óleos essenciais que contêm altas concentrações de monoterpenos fenólicos (por exemplo, carvacrol, p-cimeno e timol) possuem ótimas atividades antifúngicas a exemplo do *Origanum sp* e *Thymus sp*. Outros produtos químicos antifúngicos encontrados na família Lamiaceae, também são outros monoterpenos, como álcool linalol e 1,8-cineol cíclico, limoneno, pinenos e terpinenos cíclicos (Kordali et al., 2008; Marei, Rasoul & Abdelgaleil, 2012; Abbszadeh et al., 2014; Rivera- Yañez et al., 2017; Lima et al., 2017; Andrade et al., 2018; Wang et al., 2017; Shi

et al., 2019; Wojtunik-Kuleska et al., 2019).

A atividade dos óleos essenciais é multidirecional, podem levar à ruptura da parede celular e da membrana celular pela permeabilização, os compostos lipofílicos dos óleos essenciais podem atravessar a parede celular e danificar polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídios, tornando-os permeáveis (Wojtunik-Kuleska et al., 2019; Burt, 2004), a permeabilidade dos cátions H<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> afeta o pH celular e causar danos às organelas celulares (Helal et al., 2006; Rammanee e Hongpattarakere, 2006), podem inibir a síntese de DNA, RNA, proteínas e polissacarídeos fúngicos (Hyldgarrd, Mygind e Meyer, 2012) e ainda podem desintegrar a membrana mitocondrial (Basak & Guha, 2018; Tariq et al., 2019).

O óleo essencial de *O. basilicum* é composto por metilcavicol (85%), eucaliptol (3%), bergamoteno (2,7%), transo cimento (2%), linalol (0,8%) e eugenol (0,6%). A concentração fungicida mínima neste estudo variou entre 1,44 a 92,25µg/mL, valores abaixo do encontrado nos trabalhos de Powers et al., (2018); Bozin et al., (2006); Sacchetti et al., (2004) que foi de 30 a 625µg/ml.

O óleo essencial de *O. marajorana* é composto por terpineno-4-ol (22%), sabineno (16%) e gama-terpineno (13%). A concentração fungicida mínima neste estudo variou entre 0,66 a 21,18µg/mL, valor um pouco acima do que foi encontrado por Powers et al., (2018) que foi de 625µg/mL.

O óleo essencial de *R. officinalis* é composto por 1,8 cinelol (40%), cânfora (15%), alfa pineno (13%), beta pineno (7%) e limoneno (3%). A concentração fungicida mínima neste estudo variou entre variou entre 1,26 a 80,85µg/mL, valor um pouco acima do que foi encontrado nos trabalhos de Elansary et al., (2018); Powers et al., (2018); Khoury et al., (2016); Jiang et al., (2011); Bozin et al., (2007) que foi de 30,2 a 100µg/mL.

O óleo essencial de *S. sclarea* é composto por acetato de linalila (57%), linalol (23%), alfa-terpineol (3%), germacrene D (2%) e sclareol (2%). A concentração fungicida mínima neste estudo variou entre 1,37 a 175,5µg/mL, valores abaixo do encontrado no trabalho de Powers et al., (2018) que foi de 1250µg/mL

Vários estudos apontam que o óleo essencial de *O. vulgare* apresentam atividades antifúngicas (Vale-Silva et al., 2012; Camiletti et al., 2014; Jersek et al., 2014; Nardoni et al., 2015; Elansary et al., 2018).

Neste estudo o óleo essencial de *O. vulgare* foi o que apresentou a menor concentração fungicida mínima sobre os isolados de *C. albicans* que variou entre 0,18 a 1,5µg/mL. Na dose subinibitória inibiu a formação de tubo germinativo em 81.25% dos

isolados. Vários autores relatam que a concentração inibitória mínima do óleo essencial de orégano variou entre 0,32 a 700µg/mL. (Bozin et al., 2006, Rosato et al., 2009; Vale-Silva et al., 2012 Elansary et al., 2018; Powers et al., 2018). Adam et al., (1998) relatou a atividade fungicida desse óleo essencial a uma diluição de 1/50.000, causou uma redução de 95% no número de células metabolicamente ativas dentro de 6 horas após a exposição. Neste estudo as alterações morfológicas ocorreram em 25% (4/16) dos isolados de *C. albicans*, em relação ao controle. Os demais isolados não apresentaram crescimento na placa.

O óleo essencial de *O. vulgare* em sua maior parte é constituída de carvacrol (72%), seguido de Y- terpineno (4,5%), linalol (4%), p-cimeno (4%) e timol (2%).

O carvacrol é um fenol monoterpene um componente importante de vários óleos essenciais de plantas, tais como *Origanum* spp. *Satureja hortensis*, *Thymus* spp. e *Timbra capitata*. A atividade de alguns compostos como o carvacrol, pode estar relacionado com a inibição da biossíntese do ergosterol (Arias et al., 2011) e as propriedades antifúngicas são descritas em estudos *in vitro* e *in vivo* sobre *C. albicans* por diferentes autores (Manohar et al., 2001; Chami et al., 2004; Hossain et al., 2016; Baygar et al., 2018). Alguns trabalhos relatam a atividade anti-*Candida* deste composto químico (Chami et al., 2004; Tampieri et al., 2005; Dalleau et al., 2008), mesmo em isolados de *Candidas* spp resistentes ao fluconazol. Além disso, o carvacrol inibiu *in vitro* a formação de tubos germinativos e filamentação de *C. albicans* (Oliveira et al., 2009). No estudo de Chaillot et al., (2015) demonstraram que o carvacrol exerce atividade antifúngica gerando estresse no retículo endoplasmático de *C. albicans*.

No estudo de Vadar-Ünlü, Yagmuroglu e Unlu (2010) verificou-se a atividade *in vitro* do carvacrol em 100 isolados clínicos de *C. albicans* pelo método de microdiluição em caldo e o carvacrol foi ativo na concentração fungicida mínima de 0,064 e 0,125 µg /mL. Nesta pesquisa a concentração fungicida mínima foi de os valores de 0,0021µg/mL e 89,35µg/mL. Cinco dos isolados foram sensíveis até a concentração de 0,0021µg/mL.

Nesta pesquisa observou-se que todos os óleos essenciais estudados apresentaram concentrações fungicidas mínimas abaixo de 200µg/mL, valor interessante para compostos químicos isolados. E quanto aos compostos químicos isolados os que ficaram dentro dessa faixa foi o carvacrol e o timol.

Espera-se com esta pesquisa ter contribuído com mais produtos naturais com atividade antifúngica sobre *C. albicans*.

## 6. CONCLUSÕES

Nas condições em que foi conduzido o presente estudo, pode-se concluir que:

✚ Os óleos essenciais de *Ocimum basilicum* L, *Origanum majorana* L, *Origanum vulgare* L, *Rosmarinus officinalis* L e *Salvia sclarea* L, apresentaram atividade fungicida sobre isolados de *Candida albicans*.

✚ O óleo essencial de *O. vulgare* foi o que apresentou a menor concentração fungicida sobre os isolados de *C. albicans*.

✚ Nas doses sub inibitórias os óleos essenciais de *O. vulgare*, *R. officinalis* e *S. sclarea* inibiram em mais de 80% dos isolados de *C. albicans* a formação de tubo germinativo e alteraram em mais de 70% dos isolados a produção de franjas.

✚ O composto químico carvacrol do óleo essencial de *O. vulgare* foi o que apresentou a menor concentração fungicida sobre os isolados de *C. albicans*.

✚ Com excessão do p-cinemo todos os compostos químicos do óleo essencial de *O. vulgare* inibiram a formação de tubo germinativo e a produção de franja.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abad MJ, Ansuategui M, Bermejo, P. Active antifungal substances from natural sources. *Arkivoc.* 2007; 116-45.

Abbaszadeh S, Sharifzadeh A, Shokri H, Khosravi AR, Abbaszadeh A. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. *J. Mycol. Med.* 2014;24:e51–e56. doi: 10.1016/j.mycmed.2014.01.063.

Abdel-Massih RM, Abraham A. “Extracts of *Rosmarinus officinalis*, *Rheum rhaponticum*, and *Origanum majorana* exhibit significant anti-staphylococcal activity,” *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2014 5, 819–828.

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.

Adam K., Sivropoulou A., Kokkini S., Lanaras T., Arsenakis M. Atividades antifúngicas de *Origanum vulgare* subsp. óleos essenciais de hirtum, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia* e *Salvia fruticosa* contra fungos patogênicos humanos. *J. Agric. Food Chem.* 1998; 46: 1739-1745.

Ahmadi L, Mirza M. Essential oil of *Salvia multicaulis* Vahl from Iran. *J. Essent. Oil Res.* 1999; 11:289-90.

Akin M, Demirci B, Bagci Y, Can-Baser KH. Antibacterial activity and composition of the essential oils of two endemic *Salvia* sp. from Turkey. *Afr.J. Biotechnol.* 2010; 9, 2322–2327.

Al-Maskri AY, Hamif MA, Al-Maskari MY, Susan AA, Al-sabahi JN, Al-Mantheri O. Essential Oil from *Ocimum basilicum* (Omani Basil): A Desert Crop. *Natural Product*

Communications. 2011; 6(10): 1487-90.  
<https://doi.org/10.1177/1934578X1100601020>

Alonso J. Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos. 1. ed. Rosario, Argentina: Corpus Libros, 2004.

Alu'datt MH, Rababah T, Alhamad MN, Gammoh S, Al-Mahasneh MA, Tranchant CC, Rawshdeh M. Pharmaceutical, Nutraceutical and Therapeutic Properties of Selected Wild Medicinal Plants: Thyme, Spearmint, and Rosemary. Therapeutic, Probiotic, and Unconventional Foods, 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814625-5.00014-5>

Alves TMA, Silva AF, Brandão M, Grandi TSM, Sâmânia EFA, Sâmânia Jr A Zani CL. Biological screening of brazilian medicinal plants. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000; 98: (3):367-73.

Andrade ACM, Rosalen PL, Freires IA, Scotti L, Scotti MT, Aquino SG, Castro RD. Antifungal activity, mode of action, docking prediction and anti-biofilm effects of (+)- $\beta$ -pinene enantiomers against *Candida* spp. Curr. Top. Med. Chem. 2018;18:2481–2490. doi: 10.2174/1568026618666181115103104.

Araújo FM, Passos 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. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532009001000006>.

Araújo JCLV, Lima EO, Ceballos BSO, Freire KRL, Souza EL, Filhos LS. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. Revista de Patologia Tropical. 2004; 33(1): 55-64.

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, ALM. Avaliação in vitro da atividade antifúngica de óleos essenciais sobre *Candida albicans* [Dissertação]. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças – Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2014.

Arias CM, Eraso E, Madariaga L, Quindós G. In vitro activities of natural products against oral *Candida* isolates from denture wearers. BMC Complementary and Alternative Medicine. 2011; 11:119.

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

Basak S, Guha P. A review on antifungal activity and mode of action of essential oils and their delivery as nano-sized oil droplets in food system. J. Food Sci. Technol. 2018; 55:4701–4710. doi: 10.1007/s13197-018-3394-5.

Baygar T, Ugur A, Sarac N, Balci U, Ergun G. Functional denture soft liner with antimicrobial and antibiofilm properties. Journal of Dental Sciences. 2018; 13(3): 213-19. <https://doi.org/10.1016/j.jds.2017.10.002>

Benavides S, Villalobos-Carvajal R, Reyes JE. Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: Effect of the crosslinking degree and 50 oregano essential oil concentration. Journal of Food Engineering. 2012;110(2): 232- 9. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.05.023>

Bezerra JWA, Costa AR, Freitas MA, Rodrigues FC, Souza MA, Silva ARP, et al. Chemical composition, antimicrobial, modulator and antioxidant activity of essential oil of *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants. Comp. Immunol.Microb. 2019, 65, 58–64.

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

Bona E, Cantamessa S, Pavan M, Novello G, Massa N, Rocchetti A, Berta G, Gamalero E. Sensitivity of *Candida albicans* to essential oils: Are they an alternative to antifungal agents? J. Appl. Microbiol. 2016; 121:1530–1545. doi: 10.1111/jam.13282.

Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW. Global and multi-national prevalence of fungal diseases estimate precision. J. Fungi. 2017; 3:57. doi: 10.3390/jof3040057.

Bozin B., Mimica-Dukic N., Simin N., Anackov G. Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. J. Agric. Food Chem. 2006; 54:1822–1828. doi: 10.1021/jf051922u.

Bozin B, Mimica-Dukic N, Samojlik I, Jovin E. Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. J. Agric. Food Chem. 2007; 55:7879–7885. doi: 10.1021/jf0715323.

Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução Diretoria Colegiada nº 33 de 25/02/2003. ANVISA, seção I, p.13-16.

Braunsdorf C, LeibundGut-Landmann S. Modulation of the Fungal-Host Interaction by the Intra-Species Diversity of *C. albicans*. *Pathogens* 2018, 7, 11

Brown GD, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG, White TC. Hidden killers: Human fungal infections. Sci. Transl. Med. 2012; 4 doi: 10.1126/scitranslmed.3004404.

Busatta C, Vidal RS, Popiolski, AS et al., “Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage,” Food Microbiology, 2008. 25, (1), 207–11. DOI: 10.1016/j.fm.2007.07.003

Camiletti BX, Asensio CM, Pecci MPG, Lucini EI. Natural Control of Corn Postharvest Fungi *Aspergillus flavus* and *Penicillium* sp. Using Essential Oils from Plants Grown in Argentina. 2014; 79(12): 2499-2506. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12700>

Cardilea V, Russob A, Formisanoc C, Riganoc D, Senatorec F, Apostolides-Arnoldd N, Piozzie F. Essential oils of *Salvia bracteata* and *Salvia rubifolia* from Lebanon: chemical composition, antimicrobial activity and inhibitory effect on human melanoma cells. J. Ethnopharmacol. 2009; 126, 265–272.

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.

Carović-Stanko K., Petek M., Grdiša M., Pintar J., Bedeković D., Herak Ćustić M., Satovic Z. Medicinal plants of the family Lamiaceae as functional foods A review. Czech J. Food Sci. 2016; 34:377–390. doi: 10.17221/504/2015-CJFS

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.

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

Carvalho TM, Tosta TF, Sarmento RR, Begnini ML, Okura MH. 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, 2010. 42(3), 213-5.

Castro RD. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Canela) e de sua associação com antifúngicos sintéticos sobre espécies de *Candida*. Tese. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa. 2010; 169p.

Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases. Tracking *Candida Auris*. Case Count Updated as of July 31. CDC. Available Page last reviewed: September 11, 2020 online:

<https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/tracking-c-auris.html>. Acessado em 30/07/2020.

Chaffin WL, López-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martinez JP. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998; 62: 130-80. DOI: 10.1128/MMBR.62.1.130-180.1998

Chaillot, J. Tebbji F, Remmal A, Boone C, Brown GW, Bellaoui M, Sellam A. The Monoterpene Carvacrol Generates Endoplasmic Reticulum Stress in the Pathogenic Fungus *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59 (8); 4584 – 92. DOI: 10.1128/AAC.00551-15

Chami F, Chami N, Bennis S, Trouillas J, Remmal A: Evaluation of carvacrol and eugenol as prophylaxis and treatment of vaginal candidiasis in an immunosuppressed rat model. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 54(5): 909-914. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh436>

*Chávez-González, ML Aguilar, CN in: Chávez-González, MJ. AguilarCN, in Essential Oils Antibiotic Resistance, 2016.*

Collin H. Herbs, spices and cardiovascular disease in *Handbook of Herbs and Spices*, 2006 3.

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.

Coutinho HDM, Costa JGM, Lima EO, Silva VSF, Siqueira Jr JP, Potentiating effect of *Mentha arvensis* and chlorpromazine in the resistance to aminoglycosides of methicillin – resistant *Staphylococcus aureus*. *In vivo.* 2009; 23: 287- 290.

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

Dalleau S, Cateau E, Bergès T, Berjeaud JM, Imbert C. In vitro activity of terpenes against *Candida* biofilms. International Journal of Antimicrobial Agents. 2008; 31(6): 572-6. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.01.028>

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.

Dhaheeri YA, Eid A, AbuQamar S, Attoub S, Khasawneh M, Aiche G, Hisaindee S, Iratni R. Mitotic Arrest and Apoptosis in Breast Cancer Cells Induced by *Origanum majorana* Extract: Upregulation of TNF- $\alpha$  and Downregulation of Survivin and Mutant p53. PLoS ONE. 2013;8(2): e56649. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056649>

Dhifi W, Bellili S, Jazi S, Bahloul N, Mnif W. Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review. Medicines. 2016; 3:25. doi: 10.3390/medicines3040025

Duarte MTC. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. Multi Ciência: Construindo a história dos produtos naturais: 2006; 1-16.

Durling NE, Catchpole OJ, Grey JB, Webby RF. Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol–water mixtures. FoodChem. 2007;101:14171424.doi:10.1016/j.foodchem.2006.03.050

Dzoyem JP, McGraw LJ, Kuete V, Bakowsky U. Anti-inflammatory and Anti-nociceptive Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. Medicinal Spices and Vegetables from Africa. 2017; 239-70. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809286-6.00009-1>

Ejembi J, Suleiman M, Jimoh O, Olayinka A. Espécie de *Candida* resistente a drogas causando infecções fúngicas invasivas em uma instituição terciária no norte da Nigéria. Revista Internacional de Doenças Infecciosas. 2018;73:281.

El-Ashmawy IM, Saleh A, Salama OM. Effects of marjoram volatile oil and grape seed extract on ethanol toxicity in male rats,” Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology, 2007; 101(5):320–27. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7835.2007.00125.x>

Elansary HO, Abdelgaleil SAM, Mahmoud EA, Yessoufou K, Elhindi K, El-Hendawy S. Effective antioxidant, antimicrobial and anticancer activities of essential oils of horticultural aromatic crops in northern Egypt. BMC Complement Altern. Med. 2018;18:214. doi: 10.1186/s12906-018-2262-1.

Farjam MH. Comparative study of the antimicrobial activity of essential oil and two different extracts from *Salvia urmiensis* Bunge. Asian Pac. J. Trop. Biomed.S, 2012; 1680–S1682.

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

Furlaneto-Maia L, Specian AF, Bizerra F, Oliveira AT. *In vitro* evaluation of putative virulence attributes of oral isolates of *Candida* spp. Obtained from elderly healthy individuals. Mycopathologia. 2008; 166: 209-17. DOI: 10.1007/s11046-008-9139-7

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.

Garcia CS, Adrio JL. Antifungals. Biochemical Pharmacology. 2017; 133:86-96. DOI: 10.1016/j.bcp.2016.11.019

Gauch LMR, Silveira FG, Esteves RA, Pedrosa SS, Gugel ESC, Arruda AC, Silva SHM. Effects of *Rosmarinus officinalis* essential oil on germ tube formation by *Candida albicans* isolated from denture wearers. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2014; 47(3): 389-91.

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



Ghannoum MA, Radwan SS. *Candida* adherence to epithelial cells. CRC Press – Boston, 1990.

Giacomazzi J, Baethgen L, Carneiro LC, Millington MA, Denning DW, Colombo AL, et al. The burden of serious human fungal infections in Brazil. *Mycoses*. 2016;59(3):145–150. DOI: 10.1111/myc.12427

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.

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

Haiying Cui, Xuejing Zhang, Chengting Zhao, Lin L. Antimicrobial activity and mechanisms of *Salvia sclarea* essential oil. *Bot. Stud*. 2015; 56(1):16. doi: 10.1186/s40529-015-0096-4.

Helal GA, Sarhan MM, Abu Shahla ANK, Abou El-Khair EK. Effects of *Cymbopogon citratus* L. essential oil on the growth, lipid content and morphogenesis of *Aspergillus niger* ML2-strain. *J. Basic Microbiol*. 2006; 46:456–69. doi: 10.1002/jobm.200510106.

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

Hossain F., Follett P., Dang Vu K., Harich M., Salmieri S., Lacroix M. Evidence for synergistic activity of plant-derived essential oils against fungal pathogens of food. *Microbiol de alimentos*. 2016; 53: 24-30. doi: 10.1016 / j.fm.2015.08.006

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

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

Instituto Adolfo Lutz, Campinas, S.P. Plano de Gerenciamento de Resíduos em Serviços de Saúde, dezembro 2002; p.6-13.

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.

Jallali I, Zaouali Y, Missaoui I, Smeoui A. Variability of antioxidant and antibacterial effects of essential oils and acetonic extracts of two edible halophytes: *Crithmum maritimum* L. and *Inula crithmoïdes* L. Food Chem. 2014; 145:1031–1038. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.09.034.

Jersek B, Ulrich NP, Skrt M, Gavaric N, Bozin B, Mozina SS. Effects of selected essential oils on the growth and production of ochratoxin A by *Penicillium verrucosum*. Archives of Industrial Hygiene and Toxicology. 2014; 65(2):199-208. DOI: <https://doi.org/10.2478/10004-1254-65-2014-2486>

Jiang Y, Wu N, Fu YJ, Wang W, Luo M, Zhao CJ, Zu YG, Liu XL. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. Environ. Toxicol. Pharmacol. 2011; 32:63–68. doi: 10.1016/j.etap.2011.03.011.

Karpiński TM. Essential Oils of Lamiaceae Family Plants as Antifungals. Biomolecules. 2020; 10(1): 103 – 7. doi:10.3390/biom10010103

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

Kauffman CA. Fungal infections. Proc Am Thorac Soc 2006;3: 35-40.

Khan JA, Jalal JA, Ioannides C, Moselhy SS. Impact of aqueous doash extract on urinary mutagenicity in rats exposed to heterocyclic amines. *Toxicology and Industrial Health*.2013;29:142-8.

Khan SMA, Malik A, Ahmad I. Anti-candidal activity of essential oils alone and in combination with amphotericin B or fluconazole against multi-drug resistant isolates of *Candida albicans*. *Medical Mycology*. 2012; 50: 33–42.

Khoury M, Stien D, Eparvier V, Ouaini N, El Beyrouthy M. Report on the medicinal use of eleven Lamiaceae species in Lebanon and rationalization of their antimicrobial potential by examination of the chemical composition and antimicrobial activity of their essential oils. *Evid. Based Compl. Altern. Med*. 2016. doi: 10.1155/2016/2547169.

Kintzios SE. Oregano - The genera *Origanum* and *Lippia*. *Medicinal and Aromatic Plants - Industrial Profile*. CRC Press. 2002.

Kokkini S; Hanlidou E, Herbs of the Labiatae in *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, 2003.

Kong BH, Zhang HY, Xiong YL. Antioxidant activity of spice extracts in a liposome system and in cooked pork patties and the possible mode of action. *Meat Sci* 2010; 85(4):772–8 doi: 10.1016/j.meatsci.2010.04.003

Kordali S, Cakir A, Ozer H, Cakmakci R, Kesdek M, Mete E. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. *Bioresour.Technol*. 2008;99:87888795.doi:10.1016/j.biortech.2008.04.048.

Kozics K, Klusova V, Srancikova A. Effects of *Salvia officinalis* and *Thymus vulgaris* on oxidant-induced DNA damage and antioxidant status in HepG2 cells. *Food Chem*. 2013; 141:2198–2206.

Kreger-van Rij NJW. *The Yeasts — a Taxonomic Study*. 1984. 3<sup>o</sup> ed. Amsterdam: /Elsevier Science Publishers.

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*. 2011. 5<sup>ed</sup>. New York: Elsevier.

Lawless J. *The Encyclopaedia of Essential Oils*. Thorsons, Hammersmith, London. 2002.

Lawrence BM. Labiatae oils – mother nature's chemical factory. In: *Essential Oils*. Allured Publishing, Carol Stream, IL. 1993;188 – 206.

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.

Legrand M, Jaitly P, Feri A, d'Enfert C, Sanyal K. *Candida albicans*: An Emerging Yeast Model to Study Eukaryotic Genome Plasticity. 2019. TIGS 1536. 16.

Leonardo MR, Silva LAB, Filho MT, Bonifácio KC, Ito IY. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of a castor oil-based irrigant. *J Endod*. 2001;27(12):717-9. <https://doi.org/10.1097/00004770-200112000-00001>

Letswaart JH. Materials for a Flora of Turkey. *Origanum*. *Not. R. B.G. Edinburgh*. 1980; 38(1): 46-47.

Lima MIO, Medeiros ACA, Silva KVS Cardoso GN, Lima EO, Pereira FO. Investigation of the antifungal potential of linalool against clinical isolates of fluconazole resistant *Trichophyton rubrum*. *J. Mycol. Med*. 2017; 27:195–202. doi: 10.1016/j.mycmed.2017.01.011.

Lima SL, Francisco EC, Almeida Júnior JN, Santos DWCL, Carlasse F, Queiroz-Telles F, et al. Increasing prevalence of multidrug-resistant *Candida haemulonii* species complex among all yeast cultures collected by a reference laboratory over the past 11 years. *Journal of Fungi*, 2020 v. 6, p. 110. DOI: 10.3390/jof6030110

Lorenzi H, Matos FJA. *Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. 2. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002.

Makabe, MLF, Santos PS, Pires MFC. Higienização bucal em pacientes de Unidade de Terapia Intensiva (UTI) como fator de redução de focos de infecção secundária de um Hospital Público na cidade de São Paulo, SP, Brasil. *BEPA. Bol. Epi Paulista (ONLINE)*, 2019. 16, p. 1-15.

Makabe, MLF, Santos PS; Pires MFC. Atividade in vitro do extrato etanólico de própolis e do digluconato de clorexidina sobre espécies de *Candida* isoladas da mucosa bucal de pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI). *Rev. Ins Adolfo Lutz*, 2018; 77, p. e1750.

Manohar V, Ingram C, Gray J, Talpur NA, Echard BW, Bagchi D, Preuss HG. Antifungal activities of organum oil against *Candida albicans*. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2001; 228: 111-117.

Marei GIK, Rasoul MAA., Abdelgaleil SAM. Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. *Pesticide Biochem. Physiol.* 2012; 103:56–61. doi: 10.1016/j.pestbp.2012.03.004.

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

Morais, LAS. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. *Horticultura Brasileira*. 2009; v. 27 (2): 4050 – 63.

Nadaf M, Nasrabadi M, Halimi M. GC-MS Analysis of n-Hexane Extract from Aerial Parts of *Salvia nemorosa*. Middle-East Journal of Scientific Research. 2012; 11 (8): 1127-30.

Nardoni S, Giovanelli S, Pistelli L, Mugnaini L, Profili G, Pisseri F, Mancianti F. n Vitro Activity of Twenty Commercially Available, Plant-Derived Essential Oils against Selected Dermatophyte Species. Natural Product Communications. 2015; 10(8): 1473-8. <https://doi.org/10.1177/1934578X1501000840>

Nascimento PFC, Nascimento AC, Rodrigues CS, Antonioli AR, Santos PO, Junior MB, Trindade RC. Antimicrobial activity of the essentials oils: a multifactor approach of the methods. Rev bras farmacogn. 2007; 17(1): 108-113. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2007000100020>

Naser moadeli SN, Rowshan V, Abotalebi A. Comparison of the essential oil components in wild and cultivate population of *Salvia virgata*. Intl. Res. J. Appl. Basic. Sci., 2013, 4, 337-340.

Navarro-Arias MJ, Hernández-Chávez MJ, Garcia-Carnero LC, Amezcua-Hernández DG, Lozoya-Pérez NE, Martínez-Duncker I, et al. Differential recognition of *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, and *Candida auris* by human innate immune cells. Infect. Drug Resist. 2019, 12, 783–794.

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

Navickiene HMD, Morandim AA, Alécio AC, Regasini LO, Bergamo DCB, Telascrea M, Cavalheiro AJ, et al. Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. Química Nova. 2006; 29: 467-470.

Nenoff P, Hausteil 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.

Niu XX, Li T, Zhang X, Wang SX, Liu ZH. *Lactobacillus crispatus* modula a resposta inata das células epiteliais vaginais a *Candida albicans*. Revista Médica Chinesa, 2017; v. 130, n. 3, p. 273-279.

Nodoricimpaye EL, Obed T, Claude HJ, d'Amour MJ, Denyse N, Reverien R. *Candida albicans* infection among HIV positive and HIV negative women- Case study at Butare University Teaching Hospital (CHUB), Southern province of Rwanda. E Afr Sci. 2020;1(2):75-79. <http://doi.org/10.24248/EASci-D-19-00003>.

Nostro A, Roccaro AS, Bisignano G, Marino A, Cannatelli MA, Pizzimenti FC, et al. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. Journal of Medical Microbiology. 2007; 56(4): 519-23. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46804-0>

Nucci M, Marr K. Emerging fungal diseases. *Emerging Infections*. v.41, p. 521-526. 2005.

Oliveira AP, Salgueiro L, Oliveira RP, Oliveira JM, Vaz CP, Queiroz JA, Rodrigues AG: Anti-*Candida* activity of essential oils. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry. 2009; 9:1292-1305.

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, Vieira WL, Freire KRL, Trajano VN, Lima IO, et al. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. Rev. Bras. Farmacognosia. 2006; 16(1): 77-82. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2006000100014>

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 WA, Pereira FO, Luna GCDG, Lima IO, Wanderley PA, Lima RB, Lima EO. Antifungal activity of *Cymbopogon winterianus* jowitt ex bor against *Candida albicans*. Brazilian Journal of Microbiology. 2011; 42(2):433-41.

OMS. Manual de segurança biológica em laboratório – 3a edição. Genebra, Suíça. 2004.

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

Ostrosky EA, Mizumoto, MK, Kanekp TM, Nishikawa S, Freitas BR. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais; Revista Brasileira de Farmacognosia. 2008;18(2):301-7. DOI: 10.1590/s0102-695x2008000200026

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.

Patil S, Rao RS, Raj AT, Sanketh DS, Sarode S, Sarode G. Transplante bucal oral em indivíduos com hábitos vegetarianos puros e dietéticos mistos. Revista de Pesquisa Clínica e Diagnóstica, 2017; 11(7): 22-4.

Pelissari FM, Grossmann MVE, Yamashita F, Pineda EA. Antimicrobial, Mechanical, and Barrier Properties of Cassava Starch–Chitosan Films Incorporated with Oregano Essential Oil. J. Agric. Food Chem. 2009; 57(16): 7499–7504. <https://doi.org/10.1021/jf9002363>

Pereira RS, Sumita TC, Furlan MR, Jorge AOC, Ueno M. Atividade bacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. Rev Saúde Pública. 2004; 38 (2): 326-8.



Pfaller MA, Castanheira M. Nosocomial Candidiasis: Antifungal Stewardship and the Importance of Rapid Diagnosis. *Medical Mycology*. 2016;54(1):1-22. <https://doi.org/10.1093/mmy/myv076>

Pfaller MA, Burmeister L, Bartlett, Rinald MG. Multicenter evaluation of four methods of yeast inoculum preparation. *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26(8):1437- 41.

Phongpaichit S, Mackenzie DWR, Fraser C. Strain differentiation of *Candida albicans* by morphotyping. *Epidem. Inf.* 1987; 99: 421-428. doi: [10.1017/s0950268800067911](https://doi.org/10.1017/s0950268800067911)

Piątkowska E, Rusiecka-Ziółkowska J. Influence of essential oils on infectious agents. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2016; 25:989–995. doi: 10.17219/acem/31287.

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.

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.

Powers CN, Osier JL, McFeeters RL, Brazell CB, Olsen EL, Moriarity DM, Satyal P, Setzer WN. Antifungal and cytotoxic activities of sixty commercially-available essential oils. *Molecules*. 2018; 23:1549.

Prakash, B, Singh, P, Kedia A, and Dubey, NK “Assessment of some essential oils as food preservatives based on antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activities and *in vivo* efficacy in food system,” *Food Research International*, 2012, 49 (1), 201–208.

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

Ramadan G, El-Beih NM, Zahra MM. "Egyptian sweet marjoram leaves protect against genotoxicity, immunosuppression and other complications induced by cyclophosphamide in albino rats," *British Journal of Nutrition*, 2012; 108, (6), 1059–1068.

Ramasubramania Raja R. Medicinally potential plants of Labiatae (Lamiaceae) family: An overview. *Res. J. Med. Plant*. 2012; 6:203–213.

Rammanee K, Hongpattarakere T. Effects of tropical citrus essential oils on growth, aflatoxin production, and ultrastructure alterations of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Food Bioprocess Technol*. 2011; 4:1050–1059. doi: 10.1007/s11947-010-0507-1.

Rao S, Timsina B, Nadumane VK. Evaluation of the anticancer potentials of *Origanum majorana* on fibrosarcoma (HT-1080) cell line. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 2014;4(1):S389-94. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60476-X](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60476-X)

Rezaie, A. Jafari, B, Mousavi, G et al., "Comparative study of sedative, pre-anesthetic and anti-anxiety effect of *Origanum majorana* extract with diazepam on rats," *Research Journal of Biological Sciences*, 2011; 6, 611–614.

Rivera-Yañez CR, Terrazas LI, Jimenez-Estrada M, Campos JE, Flores-Ortiz CM, Hernandez LB, et al. Anti-*Candida* activity of *Bursera morelensis* Ramirez essential oil and two compounds,  $\alpha$ -pinene and  $\gamma$ -terpinene an in vitro study. *Molecules*. 2017; 22:95. doi: 10.3390/molecules22122095.

Roby, MHH. Sarhan, MA. Selim, KAH and Khalel, KI "Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts," *Industrial Crops and Products*, 2013; 43, (1) pp. 827–831.

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.

Rosato A, Vitali C, Piarulli M, Mazzotta M, Argentieri MP, Mallamaci R. In vitro synergic efficacy of the combination of Nystatin with the essential oils of *Origanum vulgare* and *Pelargonium graveolens* against some *Candida* species. *Phytomedicine*. 2009; 16: 972–975.

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.

Ruiz LS, Pereira VB. A importância dos fungos no ambiente hospitalar. *Boletim do Instituto Adolfo Lutz*. 2016. 26, (2),1-3.

Saad A, *et al*. Anticandidal activity of the essential oils of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* and their synergism with amphotericin B and fluconazol. *Phytomedicine*. 2010; 17(13): 1057–60.

Sacchetti G, Medici A, Maietti S, Radice M, Muzzoli M, Manfredini S, Braccioli E, Bruni R. Composition and functional properties of the essential oil of amazonian basil, *Ocimum micranthum* Willd., Labiatae in comparison with commercial essential oils. *J. Agric. Food Chem*. 2004; 52:3486–3491. doi: 10.1021/jf035145e

Sadowska B, Budzynska A, Wieckowska-Szakiel M, Paszkiewicz M, Stochmal A, Moniuszko-Szajwaj B, *et al*. New pharmacological properties of *Medicago sativa* and *Saponaria officinalis* saponin-rich fractions addressed to *Candida albicans*. *Journal of Medical Microbiology*. 2014; 63(8): 1076–86. DOI: 10.1099/jmm.0.075291-0

Sallé JL. O Totum em Fitoterapia. Robe. Editorial. 1996; 13 -14

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

Santos, PS. Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Eugenia caryophyllus*, *Thymus vulgaris* e seus compostos químicos majoritários sobre *Cryptococcus neoformans*. [Tese doutorado]. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças – Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2016.

Sato K., Makimura K., Hasumi Y, Nishiyama Y, Uchida K., Yamaguchi H. *Candida auris* sp. nov, a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. *Microbiol. Immunol.* 2009; 53:41–44.

Shan-Ju Y, Chun-Chieh Y, Chung-Yu L, Bor-Sen C. Investigating Common Pathogenic Mechanisms between Homo sapiens and Different Strains of *Candida albicans* for Drug Design: Systems Biology Approach via Two-Sided NGS Data Identification. *Toxins (Basel)*. 2019 Feb; 11(2): 119. doi: 10.3390/toxins11020119.

Shi Y, Si H, Wang P, Chen S, Shang S, Song Z, Wang Z, Liao S. Derivatization of natural compound  $\beta$ -pinene enhances its *in vitro* antifungal activity against plant pathogens. *Molecules*. 2019; 24:3144. doi: 10.3390/molecules24173144.

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 Mediciniais*. 2003; 6: 1-7.

Silva FM, Paula JE, Espindola LS. Evaluation of the antifungal potential of Brazilian Cerrado medicinal plants. *Mycoses*. 2009; 52(6):511–17.

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

Siqui AC, Sampaio, ALF, Sousa MC, Henriques MGMO, Ramos, MF. Óleos essenciais – potencial antiinflamatório. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*. 2000;16: 38-43.

Soni KA, Oladunjoye A, Nannapaneni R, Schilling MW, Silva JL, Mikel B, Bailey RH. Inhibition and Inactivation of *Salmonella Typhimurium* Biofilms from Polystyrene and Stainless Steel Surfaces by Essential Oils and Phenolic Constituent Carvacrol. *J Food Prot*. 2013;76(2):205-12. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-196>

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

Tampieri MP, Galuppi R, Macchioni F, Carelle MS, Falcioni L, Cioni PL, Morelli I. The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major componentes. *Mycopathologia*. 2005; 159: 339-45. <https://doi.org/10.1007/s11046-003-4790-5>

Tariq S, Wani S, Rasool W, Shafi K, Bhat MA, Prabhakar A, Shalla AH, Rather MA. A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. *Microb. Pathog*. 2019;134 doi: 10.1016/j.micpath.2019.103580.

Tian J, Zeng XB, Zhang S. Regional variation in components and antioxidant and antifungal activities of *Perilla frutescens* essential oils in China. *Ind Crop Prod*. 2014; 59: 69–79. doi: 10.1016/j.indcrop.

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.

Tortora GJ, Funke B, Case SL. *Microbiologia*. 12<sup>a</sup> ed. Editora Artmed. 2017; 964 p.

Tso GHW, Calderon JAR, Pavelka N. A evasiva vacina anti-cândida: lições do passado e oportunidades para o futuro. *Revista Fronteiras na Imunologia*. 2018;9(897).

Vági E, Simándi B, Suhajda A, Héthelyi É. "Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide," *Food Research International*, 2005; 38 (1), 51–57.

Vale-Silva L, Silva MJ, Oliveira D, Gonçalves MJ, Cavaleiro C., Salgueiro L., Pinto E. Correlation of the chemical composition of essential oils from *Origanum vulgare* subsp. *virens* with their in vitro activity against pathogenic yeasts and filamentous fungi. *J. Med. Microbiol.* 2012;61:252–260.

Vardar-Ünlü G, Yağmuroğlu A, Ünlü M. Evaluation of in vitro activity of carvacrol against *Candida albicans* strains, *Natural Product Research*. 2010; 24(12): 1189-93. DOI: 10.1080/14786410903565184

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

Wojtunik-Kulesza KA, Kasprzak K, Oniszczyk T, Oniszczyk A. Natural monoterpenes: Much more than only a scent. *Chem. Biodiv.* 2019;16:e19004. doi: 10.1002/cbdv.201900434.

Yaya R, Han S, Yyong D, Jae-Kwan H. Atividade *in vitro* de Xanthorrhizol contra *Candida glabrata*, *C. guilliermondii* e *C. parapsilosis* isoladas de biofilmes. *Medical Mycology*. 2011; 49: 1–9.

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

### Anexo1. Laudo técnico do Óleo essencial de Manjeriçãõ (*Ocimum basilicum*)



**FERQUIMA**

## LAUDO TÉCNICO

### Óleo Essencial de Basilicãõ (*Manjeriçãõ*)

(*Ocimum basilicum*)

CAS Number: 8015-73-4

INCI: Ocimum basilicum Oil

Itens Controlados	Especificações
Aparência	Líquido Limpido
Cor	Amarelo palha a amarelo âmbar
Impurezas	Isento
Odor	Característico
Densidade (20°C)	0,948 – 0,970
Índice de Refração (20°C)	1,510 – 1,520
Rotacãõ Ótica	[-1° ; +2°]
Principais componentes (valores aproximados)	Metilchavicol (estragol) = 85% Eucaliptol = 3%      Bergamoteno = 2,7% Transo cimento = 2%      Linalol = 0,8% Eugenol = 0,6%
Obtençãõ	Destilaçãõ a vapor das folhas.
Origem	Vietnã
Obs.:	nãõ contem OGM nem foi utilizado para teste em animais.

Recomendações Especiais	
Manuseio	Uso de luvas, óculos de segurança e máscara são recomendáveis. Não ingerir. Evitar contato com a pele, olhos e mucosas. Se isso ocorrer, lavar imediatamente com água limpa em abundância. Em caso de derramamento, absorver o material derramado com material absorvente (areia, terra).
Risco	Flash Point: 78°C. Pode provocar irritaçãõ ou alergia na pele.
Incêndio	Caso haja fogo, utilizar extintor de pó químico seco e água em forma de neblina, nãõ utilizando jatos de água para nãõ espalhar o produto. Usar equipamento de proteçãõ individual.
Explosividade	Nenhum perigo em condições normais.
Uso	Este produto destina-se ao uso profissional / industrial e como é elaborado a partir de substâncias naturais pode apresentar pequenas variações de cor e cromatografia sem causar qualquer problema na performance do produto.
Armazenamento	Armazenar em local seco, longe de umidade e do calor, protegido da luz, em recipiente original bem vedado. Não reutilizar a embalagem vazia.
Transporte	Número de risco 35 / Número da ONU 3082 / Classe ou Subclasse de risco: 3 / Descrição de classe ou subclasse: Substâncias perigosas diversas / Grupo de Embalagem: III

As informações contidas nesta publicação representam o melhor de nosso conhecimento. Entretanto, nada aqui mencionado deve ser entendido como garantia de uso. Os consumidores devem efetuar seus próprios ensaios para determinar a viabilidade da aplicaçãõ.

Engenheira Química Responsável: Alice Lasthaus      CRQ: IV 04330754

## Anexo 2. Laudo técnico do Óleo essencial de Manjerona (*Origanum majorana*)



**FERQUIMA**

### LAUDO TÉCNICO Óleo Essencial de Manjerona (*Origanum majorana*)

CAS Number: 84082-58-6

INCI: Origanum majorana Leaf Oil

Itens Controlados	Especificações
Aparência	Líquido Limpido
Cor	Amarelo palha a esverdeado
Impurezas	Isento
Odor	Herbal, condimentado
Densidade (20°C)	0,890 – 0,910
Índice de Refração (20°C)	1,460 – 1,480
Rotação Ótica	[+13° ; +24°]
Principais componentes (valores aproximados)	Terpineno-4-ol = 22% Sabineno = 16% γ-terpineno = 13%
Obtenção	Destilação a vapor das folhas
Origem	Egito
Obs.: não contém OGM nem foi utilizado para teste em animais.	

Recomendações Especiais	
Manuseio	Uso de luvas, óculos de segurança ampla visão recomendável. Não ingerir. Evitar contato com a pele, olhos e mucosas. Se isso ocorrer, lavar imediatamente com água limpa em abundância. Em caso de derramamento, absorver o material derramado com material absorvente (areia, terra).
Riscos	Produto inflamável a temperatura acima de 55°C. Pode provocar irritação ou alergia na pele.
Incêndio	Caso haja fogo, utilizar extintor de pó químico seco e água em forma de neblina, não utilizando jato de água para não espalhar o produto. Usar equipamento de proteção individual.
Explosividade	Nenhum perigo em condições normais.
Uso	Este produto destina-se ao uso profissional / industrial e como é elaborado a partir de substâncias naturais pode apresentar pequenas variações de cor e cromatografia sem causar qualquer problema na performance do produto.
Armazenamento	Armazenar em local seco, longe de umidade e do calor, protegido da luz, em recipiente original bem vedado. Não reutilizar a embalagem vazia.
Transporte	Número de risco: 30 / Número da ONU: 1169 / Classe ou Subclasse de risco: 3 / Descrição da classe ou subclasses: Líquido Inflamável / Grupo de Embalagem: III

As informações contidas nesta publicação representam o melhor de nosso conhecimento. Entretanto, nada aqui mencionado deve ser entendido como garantia de uso. Os consumidores devem efetuar seus próprios ensaios para determinar a viabilidade da aplicação.

Engenheira Química Responsável: Alice Lasthaus CRQ: IV 04330754



**Anexo 3.** Laudo técnico do Óleo essencial de Orégano (*Origanum vulgare*)



**FERQUIMA**

**LAUDO TÉCNICO**  
**Óleo Essencial de Orégano**  
*(Origanum vulgare)*

CAS Number: 84012-24-8

INCI: Origanum vulgare Leaf Oil

Itens Controlados	Especificações
Aparência	Líquido Limpido
Cor	Amarelo claro esverdeado a marrom escuro
Impurezas	Isto
Odor	Característico, especiaria
Densidade (20°C)	0,935 – 0,960
Índice de Refração (20°C)	1,500 – 1,520
Rotação Ótica	[-5° ; +2°]
Principais componentes (valores aproximados)	Carvacrol= 72%      Timol= 2% Gama-terpineno= 4,5%      Para-cimeno= 4% Linalol= 4%
Obtenção	Destilação a vapor das folhas.
Origem	Moldávia
Obs.: não contém OGM nem foi utilizado para teste em animais.	

Recomendações Especiais	
Manuseio	Uso de luvas, óculos de segurança ampla visão recomendável. Não ingerir. Evitar contato com a pele, olhos e mucosas. Se isso ocorrer, lavar imediatamente com água limpa em abundância. Em caso de derramamento, absorver o material derramado com material absorvente (areia, terra).
Risco	Podem provocar irritação ou alergia na pele.
Incêndio	Caso haja fogo, utilizar extintor de pó químico seco e água em forma de neblina, não utilizando jatos de água para não espalhar o produto. Usar equipamento de proteção individual.
Exposibilidade	Nenhum perigo em condições normais.
Uso	Este produto destina-se ao uso profissional / industrial e como é elaborado a partir de substâncias naturais pode apresentar pequenas variações de cor e cromatografia sem causar qualquer problema na performance do produto.
Armazenamento	Armazenar em local seco, longe de umidade e do calor, protegido da luz, em recipiente original bem vedado. Não reutilizar a embalagem vazia.
Transporte	Número de risco: 60 / Número da ONU: 2810 / Classe ou Subclasse de risco: 5.1 / Descrição da classe ou subclasse: Substâncias tóxicas / Grupo de Embalagem: III

As informações contidas nesta publicação representam o melhor de nosso conhecimento. Entretanto, nada aqui mencionado deve ser entendido como garantia de uso. Os consumidores devem efetuar seus próprios ensaios para determinar a viabilidade da aplicação.

Engenheira Química Responsável: Alice Lasthaus

CRQ: IV 04330754

## Anexo 4. Laudo técnico do Óleo essencial de Alecrim (*Rosmarinus officinalis*)



**FERQUIMA**

### LAUDO TÉCNICO Óleo Essencial de Alecrim (*Rosmarinus officinalis*)

CAS Number: 8000-25-7

INCI: Rosmarinus officinalis Leaf Oil

Itens Controlados	Especificações
Aparência	Líquido Limpido
Cor	Incolor a Amarelo Palha
Impurezas	Isento
Odor	Característico
Densidade (20°C)	0,900 – 0,930
Índice de Refração (20°C)	1,460 – 1,475
Rotação Ótica	[-2° ; +6°]
Principais componentes (valores aproximados)	1,8 cineol = 40%      Cânfora = 15% Alfa pineno = 13%    Beta pineno = 7% Limoneno = 3%
Obtenção	Destilação a vapor das folhas.
Origem	Marrocos ou Tunísia
Obs.: não contém OGM nem foi utilizado para teste em animais.	

Recomendações Especiais	
Manuseio	Uso de luvas, óculos de segurança ampla visão recomendável. Não ingerir. Evitar contato com a pele, olhos e mucosas. Se isso ocorrer, lavar imediatamente com água limpa em abundância. Em caso de derramamento, absorver o material derramado com material absorvente (areia, terra).
Risco	Produto inflamável a temperatura acima de 47°C. Pode provocar irritação ou alergia na pele.
Incêndio	Caso haja fogo, utilizar extintor de pó químico seco e água em forma de neblina, não utilizando jatos de água para não espalhar o produto. Usar equipamento de proteção individual.
Explosividade	Nenhum perigo em condições normais.
Uso	Este produto destina-se ao uso profissional / industrial e como é elaborado a partir de substâncias naturais pode apresentar pequenas variações de cor e cromatografia sem causar qualquer problema na performance do produto.
Armazenamento	Armazenar em local seco, longe de umidade e do calor, protegido da luz, em recipiente original bem vedado. Não reutilizar a embalagem vazia.
Transporte	Número de risco: 30 / Número da ONU: 1169 / Classe ou Subclasse de risco: 3 / Descrição da classe ou subclasse: Líquidos Inflamáveis / Grupo de Embalagem: III

As informações contidas nesta publicação representam o melhor de nosso conhecimento. Entretanto, nada aqui mencionado deve ser entendido como garantia de uso. Os consumidores devem efetuar seus próprios ensaios para determinar a viabilidade da aplicação.

Engenheira Química Responsável: Alice Laßhaus

CRQ: IV 04330754

## Anexo 5. Laudo técnico do Óleo essencial de Sálvia (*Salvia sclarea*)



**FERQUIMA**

### LAUDO TÉCNICO Óleo Essencial de Sálvia Sclarea (*Salvia sclarea*)

CAS Number: 8016-63-5

INCI: Salvia sclarea Oil

Itens Controlados	Especificações
Aparência	Líquido Límpido
Cor	Incolor a amarelo palha
Impurezas	Isento
Odor	Herbal-doce, suave
Densidade (20°C)	0,885 – 0,920
Índice de Refração (20°C)	1,450 – 1,470
Rotação Ótica	[-20° ; -5°]
Principais componentes (valores aproximados)	Acetato de linalila= 57% Linalol= 23% Alfa terpineol= 3% Germacrene D= 2% Sclareol= 2%
Obtenção	Destilação a vapor das folhas.
Origem	França
Obs.: não contem OGM nem foi utilizado para teste em animais.	

Recomendações Especiais	
Manuseio	Uso de luvas, óculos de segurança ampla visão recomendável. Não ingerir. Evitar contato com a pele, olhos e mucosa. Se isso ocorrer, lavar imediatamente com água limpa em abundância. Em caso de derramamento, absorver o material derramado com material absorvente (areia, terra).
Risco	Flash Point: 81°C. Pode provocar irritação ou alergia na pele.
Incêndio	Caso haja fogo, utilizar extintor de pó químico seco e água em forma de neblina, não utilizando jatos de água para não espalhar o produto. Usar equipamento de proteção individual.
Explosividade	Nenhum perigo em condições normais.
Uso	Este produto destina-se ao uso profissional / industrial e como é elaborado a partir de substâncias naturais pode apresentar pequenas variações de cor e cromatografia sem causar qualquer problema na performance do produto.
Armazenamento	Armazenar em local seco, longe de umidade e do calor, protegido da luz, em recipiente original bem vedado. Não reutilizar a embalagem vazia.
Transporte	Número de risco: 30 / Número da ONU: 3082 / Classe ou Subclasse de risco: 3 / Descrição de classe ou subclasse: Substâncias perigosas diversas / Grupo de Embalagem: III

As informações contidas nesta publicação representam o melhor de nosso conhecimento. Entretanto, nada aqui mencionado deve ser entendido como garantia de uso. Os consumidores devem efetuar seus próprios ensaios para determinar a viabilidade da aplicação.

Engenheira Química Responsável: Alice Lasthaus      CRQ: IV 04330754