

TAÍS JORGE DINIZ DE OLIVEIRA

Avaliação *in vitro* da atividade de óleos essenciais do gênero *Lavandula* sp 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 Mestra em Ciências.

Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria de Fátima Costa Pires

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Patricia 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, Tais Jorge Diniz de

Avaliação *in vitro* da atividade de óleos essenciais do gênero *Lavandula sp* sobre *Candida albicans* / Tais Jorge Diniz 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*. 2. *Lavandula*. 3. Óleos Voláteis.

SES/CCD/CD - 425/2020

Elaborada por Lilian Nunes Schiavon CRB 8/4083

Dedicatória

Dedico esse trabalho a minha família: a minha mãe Roseli por seu amor, a minha irmã Nadia pelo incentivo, aos meus tios Maria Cláudia, Leliana e Jorge, pela compreensão e apoio durante esse período. E a minha finada avó Eusébia que mesmo sem estudo sempre gostou da leitura e, no final de sua lucidez ainda sorria para mim quando eu dizia que não ia parar de estudar.

Agradecimentos

Para a realização desse trabalho os meus sinceros agradecimentos:

A Dra. Maria de Fátima Costa Pires, que me acolheu e acreditou na minha capacidade, sempre atenciosa e presente em todos os momentos em que me orientou.

A Dra Patricia de Souza Santos que me acompanhou durante todo o processo, me ensinando a parte prática e me corrigindo quando necessário, uma amiga verdadeira.

Aos meu colegas Fábio e Marcos, que me ajudaram durante o aprendizado e também me proporcionaram bons momentos de descontração, durante esse período.

A todos os professores da Pós Graduação que compartilharam do seu conhecimento nas aulas incríveis que tive nesse processo de formação.

Aos meus colegas de sala de aula, que caminharam junto comigo compartilhando nos momentos de estudo: a amizade e companheirismo nessa jornada.

Aos meus primos Erika e Roberto, da Faculdade Roberto Miranda, por sempre me proporcionar um local agradável e tranquilo, quando eu precisei, para estudar.

A secretária da Pós Graduação Tirces por seu trabalho e dedicação impecáveis.

Aos demais servidores da Pós Graduação que diariamente ao me encontrar, me cumprimentavam com um sorriso e sempre me desejando boa sorte com esse trabalho.

ESTA 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

ÍNDICE

RESUMO	17
ABSTRACT	18
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	19
LISTA DE FIGURAS E MICROGRAFIAS	20
LISTA DE TABELAS	21
1. INTRODUÇÃO	23
1.1 <i>Candida albicans</i>	23
1.2. Antifúngicos sintéticos	24
1.3. Antifúngicos naturais	25
1.4. Óleos essenciais	26
1.4.1. Espécies vegetais <i>Lavandula</i> sp.....	27
1.4.1.1 <i>Lavandula angustifolia</i> Mill	31
1.4.1.2 <i>Lavandula officinalis</i> Chaix.....	33
1.4.1.3 <i>Lavandula hybrida</i> E.Rev. ex Briq.....	35
2. OBJETIVOS	39
2.1 Objetivos gerais	39
2.2 Objetivos específicos	39
3. METODOLOGIA	40
3.1 <i>Candida albicans</i>	40
3.1.1 Pesquisa de tubo germinativo (Teste de Reynolds- Braude, 1956)	40
3.1.2 Pesquisa de clamidoconídios (Microcultivo em lâmina – Kreger- Van Rij, 1984)	40
3.1.3 Tipagem fenotípica	41
3.2 Óleos essenciais	42

3.3 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antifúngica dos óleos essenciais e do composto químico majoritário sobre os isolados de <i>C. albicans</i>	42
3.3.1 Preparação da suspensão de leveduras	42
3.3.2 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antifúngica dos óleos essenciais e do composto químico majoritário.....	42
3.4 Controles.....	43
3.5 Determinação da concentração fungicida mínima.....	43
3.6 Controles de qualidade e biossegurança.....	44
3.7 Descartes de resíduos.....	44
4 RESULTADOS	45
4.1 <i>Candida albicans</i>	45
4.2 Características dos óleos essenciais de <i>Lavandula angustifolia</i> Mill. <i>Lavandula officinalis</i> Chaix e <i>Lavandula hybrida</i> E.Rev. ex Briq	47
4.2.1 <i>Lavandula angustifolia</i> Mill.....	47
4.2.2 <i>Lavandula officinalis</i> Chaix.....	47
4.2.3 <i>Lavandula hybrida</i> E.Rev. ex Briq.....	47
4.3 Atividade do óleo essencial de <i>Lavandula angustifolia</i> sobre <i>Candida albicans</i>	47
4.4 Atividade do óleo essencial de <i>Lavandula officinalis</i> sobre <i>Candida albicans</i>	52
4.5 Atividade do óleo essencial de <i>Lavandula hybrida</i> sobre <i>Candida albicans</i>	56
4.6 Valores de CFM 50 e CFM 90 dos óleos essenciais sobre <i>C. albicans</i>	60
4.7 Atividade do composto químico majoritário linalol do óleo essencial de <i>Lavandula hybrida</i> sobre isolados de <i>C. albicans</i>	61
5 DISCUSSÃO	64
6 CONCLUSÕES	75
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
ANEXOS	90

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Lavandula angustifolia* Mill, *Lavandula officinalis* Chaix e *Lavandula hybrida* E.Rev. ex Briq, bem como o composto químico majoritário 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 do composto químico majoritário, em doses subinibitórias sobre a formação de tubo germinativo, clamidoconídeo e a produção de franjas, nos isolados de *C. albicans*, antes e após contato com os diferentes óleos essenciais e composto químico majoritário. Os três óleos essenciais apresentaram atividade inibitória sobre *C. albicans*. *L. angustifolia* CFM50 de 2.631,2µg/mL e CFM90 de 5.252,5µg/mL; *L. officinalis*, CFM50 de 6.467µg/mL e CFM90 de 10.612µg/mL; e *L. hybrida* CFM50 e CFM90 de 2.664µg/mL, sendo este óleo essencial o que apresentou a menor concentração fungicida sobre os isolados de *C. albicans*. Nas doses subinibitórias os óleos essenciais de *L. angustifolia*, *L. officinalis* e *L. hybrida* não inibiram a formação de tubo germinativo, clamidoconídeo e a produção de franjas. O composto químico majoritário linalol do óleo essencial de *L. hybrida* inibiram a formação de tubo germinativo e a produção de franja. Pelo exposto e nas condições desse estudo, conclui-se que o óleo essencial de *L. hybrida* apresentou a menor concentração fungicida e o composto químico linalol inibiu a formação de tubo germinativo e produção de franjas sobre os isolados biológicos de *C. albicans*.

Palavras-chave: *Candida albicans*; Lavandula; óleos voláteis

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the antifungal activity of the essential oils of *Lavandula angustifolia* Mill, *Lavandula officinalis* Chaix and *Lavandula hybrida* E.Rev. ex Briq, as well as the major chemical compound of the essential oil with the lowest minimum fungicidal concentration on 16 biological isolates of *Candida albicans*. Determine the minimum fungicidal concentrations, the effect of oils and the majority chemical compound, in subinhibitory doses on the formation of germ tube, chlamydoconid and fringe production, in the isolates of *C. albicans*, before and after contact with the different essential oils and majority chemical compound. The three essential oils showed inhibitory activity on *C. albicans*. *L. angustifolia* CFM50 of 2,631.2 µg / mL and CFM90 of 5,252.5 µg / mL; *L. officinalis*, CFM50 of 6,467µg / mL and CFM90 of 10,612µg / mL; and *L. hybrida* CFM50 and CFM90 of 2,664µg / mL, this essential oil being the one with the lowest fungicidal concentration on *C. albicans* isolates. At sub-inhibitory doses, the essential oils of *L. angustifolia*, *L. officinalis* and *L. hybrida* did not inhibit the formation of a germunative tube, chlamydoconid and fringe production. The major chemical compound linalool in the essential oil of *L. hybrida* inhibited the formation of germ tube and fringe production. From the above and in the conditions of this study, it is concluded that the essential oil of *L. hybrida* had the lowest fungicidal concentration and the chemical compound linalool inhibited the formation of a germ tube and fringe production on the biological isolates of *C. albicans*.

Keywords: *Candida albicans*; Lavandula; volatile oils

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- C. albicans* – *Candida albicans*
- °C – Celsius
- cm – centímetro
- CIM – concentração inibitória mínima
- CFM – concentração fungicida mínima
- CFM-50 - concentração fungicida mínima da substância capaz de inibir o crescimento de 50% das amostras testadas.
- CFM-90 - concentração fungicida mínima da substância capaz de inibir o crescimento de 90% das amostras testadas
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico
- HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
- L. angustifolia* – *Lavandula angustifolia*
- L. officinalis* – *Lavandula officinalis*
- L. hybrida* – *Lavandula hybrida*
- mL – mililitro
- mm – milímetro
- NCCLS - *NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARD*
- pH – potencial de Hidrogênio
- RNA – Ácido Ribonucleico
- S. cerevisae* – *Saccharoyices cerevisae*
- UFC – Unidades Formadoras de Colônias
- µL – microlitro
- TARV - tratamento antirretroviral

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de folhas do gênero <i>Lavandula</i>	29
Figura 2. Tipos de flores do gênero <i>Lavandula</i>	30
Figura 3. Folhas e flores de <i>Lavandula angustifolia</i>	32
Figura 4. Flores de <i>Lavandula angustifolia</i>	33
Figura 5. Folhas e flores de <i>Lavandula officinalis</i>	34
Figura 6. Flores de <i>Lavandula officinalis</i>	35
Figura 7. Flores de <i>Lavandula hybrida</i>	37
Figura 8. Diferenças entre <i>Lavandula angustifolia</i> e <i>Lavandula hybrida</i>	37

LISTA DE MICROGRAFIAS

Micrografia 1: tubo germinativo – isolado número 10 de <i>Candida albicans</i> - microscopia de luz- aumento 400X.....	45
Micrografia 2: clamidoconídeo, blastoconídeos e pseudohifas / hifas – isolado número 3 de <i>Candida albicans</i> - microscopia de luz – aumento 100X.....	46
Micrografia 3:	
A - Isolado número 2 de <i>Candida albicans</i> antes do contato com óleo essencial, morfotipo 7540*.	
B - Isolado número 2 de <i>Candida albicans</i> depois do contato com o óleo essencial de <i>Lavandula officinalis</i> , morfotipo 7540.....	46

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Concentração Fungicida Mínima, formação de tubo germinativo e clamidoconídio, nos isolados biológicos de *C. albicans*, antes e após contato com óleo essencial de *Lavandula angustifolia* **49**
- Tabela 2.** Concentração Fungicida Mínima e morfotipos de *C. albicans* antes e após contato com óleo essencial de *Lavandula angustifolia*..... **50**
- Tabela 3.** Valores de CFM 50 e CFM 90 do óleo essencial de *Lavandula angustifolia* sobre os isolados de *C. albicans*..... **51**
- Tabela 4.** Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima do óleo essencial de *Lavandula angustifolia* sobre isolados biológicos de *Candida albicans*..... **51**
- Tabela 5.** Concentração Fungicida Mínima, formação de tubo germinativo e clamidoconídio, nos isolados biológicos de *C. albicans*, antes e após contato com óleo essencial de *Lavandula officinalis* **53**
- Tabela 6.** Concentração Fungicida Mínima e morfotipos de *C. albicans* antes e após contato com óleo essencial de *Lavandula officinalis* **54**
- Tabela 7.** Valores de CFM50 e CFM90 do óleo essencial de *Lavandula officinalis* sobre isolados de *Candida albicans*..... **55**
- Tabela 8.** Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima do óleo essencial de *Lavandula officinalis* sobre isolados biológicos de *Candida albicans*..... **55**

Tabela 9. Concentração Fungicida Mínima, formação de tubo germinativo e clamidoconídio, nos isolados biológicos de <i>C. albicans</i> , antes e após contato com óleo essencial de <i>Lavandula hybrida</i>	57
Tabela 10. Morfotipos dos isolados biológicos de <i>C. albicans</i> , antes e após contato com óleo essencial de <i>Lavandula hybrida</i>	58
Tabela 11. Valores de CFM50 e CFM90 do óleo essencial de <i>Lavandula hybrida</i> sobre isolados de <i>Candida albicans</i>	59
Tabela 12. Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima do óleo essencial de <i>Lavandula hybrida</i> sobre isolados biológicos de <i>Candida albicans</i>	59
Tabela 13. Valores de CFM50 e CFM90 do óleo essencial de <i>Lavandula angustifolia</i> , <i>Lavandula officinalis</i> e <i>Lavandula hybrida</i> sobre isolados de <i>Candida albicans</i>	60
Tabela 14. Concentração Fungicida Mínima, formação de tubo germinativo e morfotipos sobre <i>Candida albicans</i> antes e após contato com o composto químico majoritário linalol do óleo essencial de <i>Lavandula hybrida</i>	62
Tabela 15. Valores de CFM 50 e CFM 90 do óleo essencial de <i>Lavandula hybrida</i> sobre os isolados de <i>C. albicans</i>	63
Tabela 16. Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima do composto químico majoritário linalol do óleo essencial de <i>Lavandula hybrida</i> sobre isolados biológicos de <i>Candida albicans</i>	63

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Candida albicans*

Leveduras do gênero *Candida* são microrganismos comensais, presentes em indivíduos saudáveis. Na maioria dos pacientes, a infecção por estas leveduras é decorrente principalmente do reservatório endógeno como a mucosa bucal, vaginal, esofágica e gastrointestinal. Entre as manifestações clínicas mais comuns têm-se infecções superficiais, limitadas ao tecido mucoso e/ou cutâneos e sistêmicas quando se dissemina pelo sangue e sistema linfático, alcançando sítios, como coração, sistema nervoso central, fígado e pulmões (Giolo e Svidzinski, 2010; Araújo et al., 2012; Martins et al., 2015; Legrand et al., 2019).

A capacidade de um microrganismo oportunista se tornar patogênico está relacionado a uma combinação de fatores como, a virulência da cepa e desordens imunológicas do hospedeiro (Bezzera et al., 2019; Legrand et al., 2019; Navarro-Arias et al., 2019; Shan-Ju et al., 2019).

Candida albicans ainda é a espécie mais isolada especialmente em indivíduos imunocomprometidos (Ndoricyimpaye et al., 2020). Mas nos últimos anos 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. As adesinas são importantes na colonização e formação de biofilme, um fator de virulência para candidíase (Samaranayake, 1990; Pires et al., 2001; Naglik et al., 2019), bem como a produção de exoenzimas, proteinase e fosfolipase (Chaffin, 2008). Outras propriedades dessa levedura é a formação de tubo germinativo, a variabilidade fenotípica (Samaranayake,

1990), 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). As hifas apresentam uma toxina específica, a candidalísina que invade as células da mucosa facilitando a invasão fúngica em tecidos mais profundos. Ter como alvo a inibição dos fatores de virulência pode reduzir o risco de desenvolvimento de resistência em infecções por *Candida*. (Staniszewska, 2020).

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 (Phonpaichit et al., 1987, modificado por Hunter et al., 1989).

Nas últimas três décadas, o crescimento do número de intervenções cirúrgicas e as novas terapias imunossupressoras, contribuíram para o aumento das infecções fúngicas invasivas, sendo o principal desafio para a saúde global, particularmente para pacientes de baixa renda e acesso limitado aos antifúngicos (Ndoricyimpaye et al., 2020).

1.2 Antifúngicos sintéticos

Um dos grandes desafios para o desenvolvimento dos antifúngicos está na dificuldade de se desenvolver um medicamento que atue em um microrganismo eucariota, mas que não seja tóxica a célula do hospedeiro. Para Bona (2016) os efeitos dos antifúngicos, usados em grandes concentrações e por longos períodos, adicionado ao número crescente de organismos resistentes, faz com que a infecção por fungos seja considerada um problema.

Os antifúngicos são classificados de acordo com o seu mecanismo de ação como a ruptura da membrana celular, a inibição da síntese de ergosterol, a inibição da síntese de β -1,3-d-glucano (Shabaan et al., 2018) e a indução

incorreta do RNA e também interferência na replicação do Ácido Desoxirribonucleico (DNA) (Williams et al., 2011).

Alguns dos antifúngicos mais comuns no mercado são a anfotericina B e a nistatina que alteram a membrana do fungo, e a classe dos azóis como o cetoconazol, fluconazol, itraconazol e voriconazol; que inibem a biossíntese do ergosterol. Os mecanismos de resistência a esses medicamentos podem incluir a alteração da permeabilidade das barreiras em associação à formação de biofilmes e mutações que resultam em membranas celulares que são desprovidas de ergosterol (Hamdy et al., 2020).

C. albicans é a principal espécie associada à candidíase invasiva nosocomial. No entanto, há um aumento preocupante no número de espécies de *Candida* não *albicans* como *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e por último *C. auris*, com resistência especialmente ao fluconazol antifúngico comumente usado para profilaxia e tratamento de infecções por *Candida* em muitas partes do mundo (Arendrup et al., 2013; Bongomin et al., 2017).

Para Berkow e Lockhart (2017) a resistência aos medicamentos é um processo inevitável de seleção por meio do uso contínuo de antifúngicos. Mas, para Dismukes (2000) o uso injustificável do fluconazol e outros azóis como em terapia profilática, consistem em mais um problema para o aumento de casos de resistência.

Pelo exposto torna-se imprescindível novos produtos eficientes e com baixa toxicidade, necessária para o tratamento dessas infecções (Ruiz e Pereira, 2016; Giacomazzi et al., 2016; Bongomin et al., 2017).

1.3 Antifúngicos naturais

As plantas utilizadas por gerações, foram a primeira escolha de tratamento, o seu potencial terapêutico levou em consideração os efeitos observados no corpo incluindo também os efeitos tóxicos dependendo da dose, não se sabia sobre a natureza dos constituintes e os motivos desses efeitos. Os compostos bioativos presentes nas plantas resultam de metabólitos primários (proteínas, lipídeos, carboidratos e clorofila) e

secundários (alcaloides, terpenos, ésteres e compostos fenólicos) (Martins et al., 2015). 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).

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

1.4 Óleos essenciais

O termo “óleo essencial” foi introduzido no século XVI e consiste em misturas complexas com diversos compostos que desde a antiguidade são utilizados pelas propriedades medicinais como analgésicos, sedativos, anti-inflamatórios e antimicrobianos (Nazzaro et al., 2017). Utilizados desde a Idade Média, extraídos de plantas aromáticas eles apresentam compostos voláteis com um odor forte característico. Nas plantas esses compostos são resultantes de metabólitos secundários com função na defesa contra microrganismos e herbívoros, e também para a atração de polinizadores e dispersores de sementes (Bakkali et al., 2008), esses óleos são misturas naturais que podem conter de 20 a 60 componentes com concentrações variadas (Bizzo, 2009), caracterizados por dois ou três componentes com maiores concentrações (20 – 70%) em comparação aos demais componentes em pequenas concentrações ou traços (Bakkali et al., 2008).

O uso de óleos essenciais frente à infecção por *Candida* tem como objetivo encontrar uma substância com melhor desempenho em virtude da resistência dessas espécies aos antifúngicos sintéticos (Almeida, 2011; Castro e Lima, 2011).

Diversos estudos foram realizados utilizando óleos essenciais de diferentes espécies de plantas com atividade fungicida frente à *Candida albicans*, como os óleos de *Ocimum basilicum* (manjeriçã), *Cymbopogon martinii* (palmarosa), *Thymus vulgaris* (tomilho) e *Cinnamomum cassia* (canela da china) em cepas de *C. albicans* isoladas de pacientes HIV positivos (Almeida, 2011). Os óleos de *Melaleuca alternifolia* (Melaleuca), *Cymbopogon winterianus* (Citronela) e *Rosmarinus officinalis* (Alecrim) apresentaram atividade fungicida sobre *Candida sp* no estudo realizado por Cavalcante, Almeida e Padilha (2011). A *Calendula officinalis* (margarida) apresentou potencial antifúngico (Gazim et al., 2008) assim como a *Cymbopogon citratus* (capim-limão) (Silva et al., 2008). Lima et al., (2006) avaliaram a atividade fungicida de *Cinnamomum zeylanicum* (canela) e a *Peumus boldus* (boldo do Chile).

Lima et al. (2006) reafirma o potencial fungicida dos óleos essenciais e a sua possibilidade de utilização em produtos que atuam na prevenção e tratamento de doenças infecciosas assim como, a realização de estudos toxicológicos e clínicos para o uso seguro desses compostos como fármacos.

Toledo (2013) avaliou a atividade fungicida do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* sobre isolados de *C. albicans* e a atividade na odontologia. Araújo (2015), pesquisou a atividade fungicida sobre isolados de *C. albicans*, dos óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora*, *Thymus vulgaris*, *Eucalyptus globulus*, *Eugenia caryophyllus* e *M. alternifolia*. Esses mesmos óleos apresentaram atividade fungicida sobre *Cryptococcus neoformans*, entretanto o óleo essencial de *M. alternifolia* não apresentou o efeito esperado para o *Cryptococcus*, enquanto os óleos essenciais de *T. vulgaris* e *E. caryophyllus* apresentaram atividade antifúngica (Santos, 2011 e 2016).

1.4.1 Espécies vegetais de *Lavandula sp*

O gênero *Lavandula* é de conhecimento dos botânicos há séculos, encontraram-se citações em escritos gregos como o do estudioso Teofrasto (370-285 a.C.) (Lis-balchin, 2002). Teofrasto é considerado o Pai da Botânica,

no seu livro “*Historia Plantarum*” (História das Plantas - Livro VI) a *Lavandula* é considerada uma espécie de subarbusto de cultivo (tradução livre para o Português) e, (a espécie *Lavandula stoechas*) aparece com o nome de “nigela-dos-trigos” (numa tradução para o Português) como uma planta vigorosa de raiz forte, com florescimento de poucos dias no mês de Maio, “mais próprias do Verão” (Teofrasto *apud* Silva e Paiva; 2016).

Esse gênero compõe cerca de trinta e duas espécies de Lavanda e seus híbridos descritas na literatura. Algumas espécies têm sido cultivadas desde a antiguidade como plantas de jardins além de horticulturas e o nome “Lavandula” deriva-se da palavra latina “lavare” que faz uso dessa planta para perfumar a água para o banho (Lis-Balchin, 2002), no qual a palavra “lavare” (presente no idioma italiano) significa “lavar” (Michaelis, 2009).

A *Lavandula sp* conhecida popularmente como lavanda ou alfazema é classificada no Reino Plantae; Filo Magnoliophyta; Classe Eudicotiledoneas; Subclasse Asteridae; Ordem Lamiales; Família Lamiaceae; Gênero *Lavandula* (Adamuchio, Deschamps, Machado, 2017). Na família *Lamiaceae* estima-se que foram descritas aproximadamente 200 gêneros e 3200 espécies (Lima, Cardoso, 2007).

Da família *Lamiaceae*, o gênero *Lavandula* apresenta espécies que podem ser perenes ou anuais. Arbustos, subarbustos perene com caules geralmente lenhosos, frequentemente aromáticos e, suas folhas têm características variadas (Figura 1), podem ser opostas, simples, inteiras, dentadas, pinadas ou bipinadas; e os tricomas geralmente são conectados a glândulas (Lis-Balchin, 2002; Adamuchio, Deschamps, Machado, 2017), com certa tolerância à temperaturas, e originárias do Mediterrâneo com distribuição desde o norte da África, Mediterrâneo, até a Europa e oeste da Índia.

A inflorescência se encontra num pico terminal do pedúnculo que pode ser ramificado: as flores formam um “cacho” ou espiga com uma flor ou de 3 a 9 flores que podem variar nas cores verde, vermelha, roxa e branca (Lis-Balchin, 2002; Adamuchio, Deschamps, Machado, 2017). As flores apresentam um formato tubular com até cinco lobos curtos, ou dois maiores e

os demais menores (Figura 2), e a sua cor varia do violeta, branco, roxo e até azul escuro (Adamuchio, Deschamps, Machado, 2017).

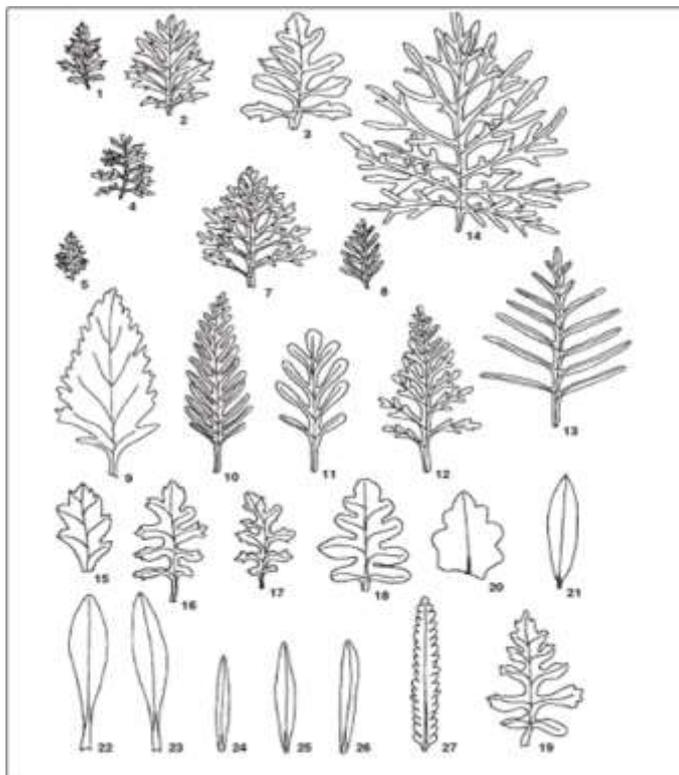


Figura 1. Tipos de folhas do gênero *Lavandula*. (Fonte: Lis-Balchin; 2002).



Figura 2. Tipos de flores do gênero *Lavandula* . Fonte: Lis-Balchin; 2002).

As espécies usadas para a produção de óleos essenciais são a *L. officinalis* Chaix, *L. vera* DC e *L. angustifolia* Mill; que são chamadas de Lavanda verdadeira ou genuína. As espécies chamadas de Alfazema são a *L. latifolia* Mill e a *L. spica*; o Lavandim consiste nas espécies *L. hybrida* Revr e *L. intermedia* Emeric (Salehi et al., 2018).

Os óleos essenciais resultantes dos metabólitos secundários apresentam majoritariamente, compostos chamados terpenos com grande atividade, contra bactérias, fungos e protozoários sugerindo uma atividade na membrana celular desses patógenos (Lima, Cardoso, 2007)..

O óleo essencial de *Lavandula* é composto majoritariamente por linalol (terpeno) e acetato de linalila, mas a sua composição varia de acordo com a espécie, variando com a genética e a forma de cultivo como a temperatura, quantidade de água, altitude, época do ano, fertilizantes e distribuição geográfica. As variações dos compostos químicos também variam nas espécies híbridas que são cultivadas com mais frequência devido ao maior rendimento nos óleos essenciais (Lis-Balchin, 2002).

Acredita-se que todas as espécies tenham algum grau de propriedade medicinal (Lis-Balchin, 2002 e Salehi et al., 2018).

Todas as informações e fotos são do International Plant Name Index (IPNI), disponível em: <https://www.ipni.org/> e em Royal Botanic Gardens Kew, disponível em: <https://www.kew.org/science> . O IPNI é produzido em colaboração entre The Royal Botanic Gardens, Kew, The Harvard University Herbaria e The Australian National Herbarium, e organizado por Royal Botanic Gardens Kew, que fornece informações sobre a nomenclatura de plantas vasculares (grafia, autor, tipos e a data de publicação).

1.4.1.1 *Lavandula angustifolia* Mill

Lavandula angustifolia foi descrita por Philip Miller (1691 – 1771) botânico inglês que nomeou 1854 espécies, publicado no “Gardeners Dictionary” em Abril de 1768. Espécie nativa do Sul da França à Itália. É também aceita como *Lavandula angustifolia* subsp. *angustifolia* e *Lavandula angustifolia* subsp. *pirenaica* (DC.) Guiné. Essa identificação aceita por: Govaerts, R. (2003). World Checklist of Selected Plant Families Database in ACCESS:1-216203. The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew. Possui nove sinônimos: *Lavandula angustifolia* f. *albiflora* (Rehder) Geerinck; *Lavandula angustifolia* var. *delphinensis* (Jord. ex Billot) O.Bolòs & Vigo; *Lavandula delphinensis* Jord. ex Billot; *Lavandula fragrans* Salisb; *Lavandula minor* Garsault; *Lavandula officinalis* Chaix; *Lavandula officinalis* f. *albiflora* Rehder; *Lavandula spica* L ; *Lavandula vulgaris* Lam.

Informações do Royal Botanic Gardens Kew e disponível em:

<http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:77171433-1>

Informação de IPNI disponível em: <https://www.ipni.org/n/449008-1>

Publicação - *Lavandula angustifolia* Mill., Gard. Dict., Ed. 8. n. 2 (1768) – disponível em: <https://www.ipni.org/p/957-2>

Philip Miller – disponível em: <https://www.ipni.org/a/6485-1>

O óleo essencial de *Lavandula angustifolia* foi amplamente difundido na era Vitoriana como perfume e outros cosméticos, associado a outras fragrâncias. Considerado o óleo de Lavanda mais benéfico, é muito utilizado

na aromaterapia como relaxante mental e físico, quando inalado ou massageando a pele. Originária do centro e sudeste da Europa a *L. angustifolia* é conhecida também como Lavanda Inglesa sendo uma das espécies mais comercializadas (junto com o Lavandim) pelo seu óleo essencial e como planta ornamental (Figura 3 e 4) (Lis-Balchin, 2002).

O arbusto apresenta coloração cinza quando jovem que fica verde ao longo que envelhece, o caule onde se origina a inflorescência não é ramificado geralmente, com 10 a 25 cm de comprimento e uma haste compacta (4-5 até 8 cm) as vezes com um grupo de flores mais baixo do ponto principal. As flores podem ter a cor azul violeta com inflorescência de 30 cm, violeta escuro de 45 cm, lilás ou róseas com 45 cm e uma variante branca anã com 20 cm. A variação dessa espécie não é totalmente compreendida resultando em mais de um nome na literatura (Lis-Balchin, 2002).



Figura 3. Folhas e flores de *Lavandula angustifolia* - Jardim Botânico da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD) – Portugal. Fonte:

https://jb.utad.pt/multimedia/Lavandula_angustifolia



Figura 4. Flores de *Lavandula angustifolia* – Royal Botanic Gardens Kew –
Fonte: <https://www.kew.org/read-and-watch/best-plants-for-may-garden>

1.4.1.2 *Lavandula officinalis* Chaix

A espécie *Lavandula officinalis* foi descrita por Dominique Chaix (1730 – 1799) botânico, que nomeou 58 espécies, publicado em “[Histoire des Plantes de Dauphiné: Contenant une Préface Historique, un Dictionnaire des Termes de Botanique, les Classes, les Familles, les Genres, & les Herborisations des Environs de Grenoble, de la Grande Chartreuse, de Briançon, de Gap & de Montelimar. Paris](#)” , em Fevereiro de 1786. Essa espécie considera-se como sinônimo da espécie *Lavandula angustifolia* subsp. *angustifolia*, não aceita pelos autores:

Castroviejo, S. & al. (eds.) (2010). Flora Iberica 12: 1-650. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid. [Citado como *Lavandula angustifolia* subsp. *pyrenaica*.,
Upson, T. & Andrews, S. (2004). The Genus *Lavandula*: 1-442. The Royal Botanic Gardens, Kew. [Citado como *Lavandula angustifolia* subsp. *angustifolia*. e
Govaerts, R. (2003). World Checklist of Selected

Plant Families Database in ACCESS:1-216203. The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew. [Citado como *Lavandula angustifolia*.].

Informação de Royal Botanic Gardens Kew disponível em: <http://powo.science.kew.org/taxon/449067-1#other-data>

Informação de IPNI disponível em: <https://www.ipni.org/n/449067-1>

Publicação - *Lavandula officinalis* Chaix, *Hist. Pl. Dauphiné (Villars)* 1: 355 (1786). Disponível em: <https://www.ipni.org/p/7611-2>

Dominique Chaix – disponível em: <https://www.ipni.org/a/1493-1>

A *Lavandula officinalis* é considerada uma subdivisão da *L. angustifolia*, nativa do oeste do Mediterrâneo. Encontrada na parte Sul e Central da Europa (Itália, França e Espanha) em áreas montanhosas, o que torna mais difícil o cultivo, a *L. officinalis* também é conhecida como *L. angustifolia* subsp. *angustifolia*. Os diferentes nomes na literatura remetem ao fato de ser uma variação natural na espécie que não está compreendida em toda a sua extensão. Além de produzir um óleo essencial de maior qualidade, essa espécie também é uma planta ornamental (Figura 5 e 6) (Lis-Balchin, 2002).



Figura 5. Folhas e flores de *Lavandula officinalis* - Le Jardin – Parque de Lavanda (Gramado/RS) – Fonte: <https://lavandas.com.br/lavandas/#prettyPhoto>



Figura 6. Flores de *Lavandula officinalis* – Fonte: Kalantar, M; Shirali, S; Hasanvand, A; Valizadeh, M; et al.. Ameliorative Effects of Hydroalcoholic Extract of *Lavandula officinalis* L. on Methotrexate-Induced Oxidative Stress in Rats. *Pharmaceutical Sciences*, March 2017, 23, 18-26. <https://www.semanticscholar.org/paper/Ameliorative-Effects-of-Hydroalcoholic-Extract-of-Kalantar-Shirali/dcb2021fc492c8a602cf6145b097c8f948b40ef4>

1.4.1.3 *Lavandula hybrida* E.Rev. ex Briq. (Lavandim)

A espécie *Lavandula hybrida* foi descrita por John Isaac Briquet (1870 – 1931) botânico, que nomeou 1848 espécies, publicado em “Lab. Alp.” em Março de 1895. Essa espécie considera-se como sinônimo da espécie *Lavandula latifolia* Medik. E não aceita por:

Castroviejo, S. & al. (eds.) (2010). *Flora Iberica* 12: 1-650. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid. [Citado como *Lavandula x intermedia* subespécie. *aurigerana*. e Govaerts, R. (2003). *World Checklist of Selected Plant Families Database* in ACCESS:1-216203. The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew. [Citado como *Lavandula latifolia*.]

Informação de Royal Botanic Gardens Kew disponível em:

<http://powo.science.kew.org/taxon/449045-1>

Publicação - *Lavandula hybrida* Reverchon

ex Brig., Lab. Alpes. Marit. iii. (1895) 469. Disponível em:

<https://www.ipni.org/n/449045-1>

John Isaac Briquet – disponível em: <https://www.ipni.org/a/1152-1>

A *Lavandula hybrida* (Lavandim) consiste numa espécie híbrida que inicialmente foi cultivada no sul da França e atualmente se encontra no mundo todo. Produzido pelo cruzamento entre a *L. angustifolia* e a *L. latifolia*, o óleo apresenta cor amarelo pálido quase incolor com odor forte herbáceo, e geralmente é combinado com produtos naturais e sintéticos na perfumaria, sendo um arbusto muito variado dificultando a delimitação da espécie com os sinônimos *L. intermedia* Emeric ex Loisel e *L. hortensis* Hy (Figura 7 e 8) (Lis-Balchin, 2002).

Esse híbrido estéril ocorre naturalmente na fronteira entre França, Espanha e Itália, é um arbusto entre 60 e 150 cm e a haste da sua inflorescência é ramificada como uma espiga. Com características variadas essa espécie pode apresentar flores de 100 cm brancas, flores violetas com 80 cm e folhas cinza, de flores lilás a roxas de 90 cm com folhagem verde; o Lavandim “Grosso” possui uma inflorescência azul-violeta escura que é a Lavanda mais popular para a produção do óleo essencial (Lis-Balchin, 2002).



Figura 7. Flores de *Lavandula hybrida*. Fonte: https://www.researchgate.net/figure/A-sample-species-Lavender-Lavandula-hybrida-most-commonly-used-for-green-side_fig2_233979789



Figura 8. Diferenças entre *Lavandula angustifolia* e *Lavandula hybrida* – Benvenue em Provence/Lavande. Fonte: Disponível em: <https://www.lavande-aop.fr/lavande/lavandin>

As plantas do gênero *Lavandula*, vem sendo utilizadas para uma variedade de propósitos cosméticos e terapêuticos. As principais espécies de uso medicinal são *Lavandula augustifolia*, *Lavandula officinalis* e *Lavandula hybrida*. O óleo essencial de lavanda é bastante utilizado na aromaterapia, com efeitos neurológicos benéficos no alívio dos sintomas de estresse e depressão. Também são relatados efeitos antiespasmódico, analgésico, pesticida e antimicrobiano (Cavanagh e Wilkinson, 2002), como atividade antifúngica (Dafera, Ziogas e Polissiou, 2000). Os constituintes do óleo essencial de uma mesma espécie de lavanda podem variar consideravelmente dependendo do cultivo e método de extração e essa variação poderá determinar o valor de mercado e as possíveis aplicações do produto (Cavanagh e Wilkinson, 2002). Diferenças na composição química tornam alguns óleos essenciais mais efetivos contra determinadas espécies microbianas, direcionando seu uso terapêutico (Cavanagh e Wilkinson, 2005).

Pelo exposto e relevante contribuir com novas opções terapêuticas, eficazes e seguras de baixo custo para a população e maior acessibilidade ao produto, no controle de condições mórbidas prevalentes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar *in vitro* a atividade dos óleos essenciais de *Lavandula augustifolia*, *Lavandula officinalis* e *Lavandula hybrida* sobre isolados biológicos de *Candida albicans*, bem como o composto químico majoritário do óleo essencial com a menor concentração fungicida mínima sobre isolados biológicos de *Candida albicans*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar *in vitro* a atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Lavandula augustifolia*, *Lavandula officinalis* e *Lavandula hybrida* sobre isolados biológicos de *C. albicans*;
- Determinar as concentrações fungicidas mínimas dos óleos essenciais de *Lavandula augustifolia*, *Lavandula officinalis* e *Lavandula hybrida* sobre *C. albicans*;
- Avaliar e comparar a formação de tubo germinativo, clamidoconídio e a produção de franjas, em isolados de *C. albicans* antes e após contato com os diferentes óleos essenciais.
- Avaliar e determinar *in vitro* a concentração fungicida mínimas do composto químico majoritário 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 o composto químico majoritário do óleo essencial com a menor concentração fungicida mínima sobre *C. albicans*.

3. METODOLOGIA

3.1 *Candida albicans*

Foram utilizados 16 isolados biológicos 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 cultivo em lâmina, descritos segundo a técnica de Kreger van Rij (1984), Kurtzmann & Fell (2011).

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

Amostras de *C. albicans* foram submetidas às provas de pesquisa de tubo germinativo (teste de Reynolds – Braude). Leveduras com 24 horas de crescimento em ágar Sabouraud dextrose (Difco) - acrescido de 200 µg/mL cloranfenicol - foram semeadas em tubos de ensaio contendo 1mL de soro fetal bovino (Gibco) e incubadas a 37°C por até 3 horas. A pesquisa da formação de tubo germinativo foi observada a cada hora, por até 3 horas, no microscópio ótico de luz. Pesquisa realizada antes e após contato com óleos essenciais e o composto químico majoritário do óleo essencial com a menor concentração fungicida mínima sobre *C. albicans*.

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

Amostras cultivadas em lâmina, como descritas segundo a técnica de Kriger van Rij, 1984, Kutzeman e Fell, 2011. O meio composto por 17,0 g de Ágar “Corn-meal (*Difco*)” acrescido de 2,8 g Tween 20 (*BBL*) e 1000 mL de água destilada (Lacaz, 2002), foi esterilizado em autoclave a 120°C por 15 minutos. No momento do uso, volume de 3 mL foi distribuído em lâminas de microscopia. As leveduras cultivadas anteriormente em ágar Sabouraud-dextrose (*Difco*) por 24 horas foram semeadas em estrias nesta lâmina, e

recobertas com lamínula estéril. Essa preparação foi colocada em câmara úmida por até cinco dias, mantida a 25°C, para observação da produção de filamentação e de clamidoconídeos, sendo as leituras utilizando a microscopia ótica comum, realizadas diariamente. Pesquisa realizada antes e após contato com óleos essenciais.

3.1.3 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 *et al.*, (1989): o meio de cultura é o ágar extrato de malte assim constituído - 60,0 g de extrato de malte, (Merck), 20,0 g de ágar (Dífico) e 1000,0 mL de água destilada. O meio foi esterilizado a 120°C por 20 minutos e distribuído em placas de Petri (20 mL em cada placa). As suspensões de leveduras cultivadas por 48 horas 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 duas a quatro por placa e incubadas a 25°C, por 10 dias. Pesquisa realizada antes e após contato com óleos essenciais e o composto químico majoritário do óleo essencial com a menor concentração fungicida mínima sobre *C. albicans*.

Os resultados foram avaliados segundo os aspectos macromorfológicos da franja e superfície das colônias de tal modo que resulte em um biotipo composto por quatro dígitos, de acordo com o modelo de tipificação de Hunter *et al.*, (1989):

1º Franja – distribuição: Ausente (0); Descontínua (>20% da margem) (1); Descontínua (21 a 50% da margem) (2); Descontínua (51 a 90% da margem) (3); Contínua, somente na periferia ou fios conspícuos em leques (5); Contínuas com filamentos paralelos (7).

2º Franja- comprimento: Ausente (0); Igual ou menor do que 2mm (2), de 3 a 5 mm (3); Igual ou maior do que 6 mm (5).

3º Franja – Textura: Ausente (0); Muito grosseira (1); Intermediária (3); Fina (4).

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

3.2 Óleos essenciais

O presente trabalho utilizou os óleos essenciais de três espécies de Lavanda, *Lavandula angustifolia* Mill, *Lavandula officinalis* Chaix e o *Lavandula hybrida* E.Rev. ex Briq., adquiridos da empresa Ferquima® Ind. Com. Ltda. (Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil). Os parâmetros de qualidade: aparência, cor, pureza, odor, densidade - 20°C, índice de refração - 20°C foram descritos em um relatório técnico anexo (Anexo 1, 2, 3, 4 e 5). 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 o composto químico majoritário do óleo essencial com a menor concentração fungicida mínima sobre isolados biológicos de *Candida albicans* foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich®.

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

3.3.1 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.*, 1998). 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.

3.3.2 Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica dos óleos essenciais e composto químico majoritário.

Para a pesquisa *in vitro* da atividade antifúngica dos óleos essenciais *Lavandula augustifolia*, *Lavandula officinalis* e *Lavandula hybrida* e do composto químico majoritário foram realizados em microplacas, de fundo chato, com 96 poços e capacidade de 300µl. 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 a 0,02% de concentração (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.

3.4 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 para o 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.

3.5 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 do composto químico majoritário 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.

3.6 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).

3.7 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).

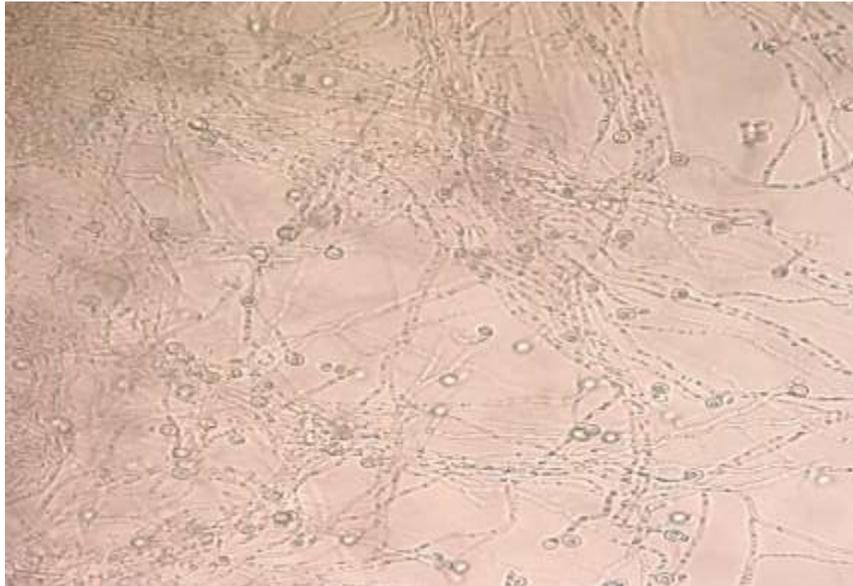
4 RESULTADOS

4.1 *Candida albicans*

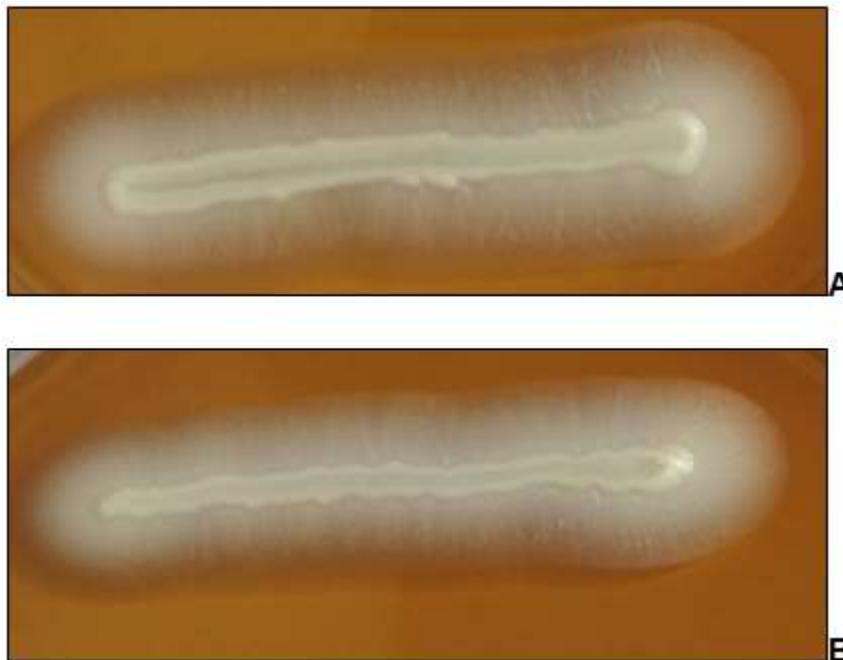
Os 16 isolados utilizados nesta pesquisa foram reidentificados como *Candida albicans* 100% (16/16) e todos apresentaram tubo germinativo e clamidoconídeos antes do contato com os óleos essenciais (Micrografia 1 e 2). Foram encontrados 21 morfotipos diferentes, sendo que 11 deles presentes em isolados antes do contato com os óleos essenciais e produto químico. O morfotipo 7540 esteve presente em torno de 50% dos isolados antes do contato com os óleos essenciais (7- franjas contínuas com filamentos paralelos; com comprimento igual ou maior do que 6 mm) (Micrografia 3).



Micrografia 1: tubo germinativo – isolado número 10 de *Candida albicans* - microscopia de luz- aumento 400X.



Micrografia 2: clamidoconídeo, blastoconídeos e pseudohifas / hifas – isolado número 3 de *Candida albicans* - microscopia de luz – aumento 100X.



Micrografia 3: **A** - Isolado número 2 de *Candida albicans* antes do contato com óleo essencial, morfotipo 7540*. **B** - Isolado número 2 de *Candida albicans* depois do contato com o óleo essencial de *Lavandula officinalis*, morfotipo 7540*.

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

4.2 Características dos óleos essenciais de *Lavandula angustifolia* Mill; *Lavandula officinalis* Chaix e *Lavandula hybrida* E.Rev. ex Briq.

4.2.1 *Lavandula angustifolia* Mill

O óleo essencial de *Lavandula angustifolia* utilizado nesta pesquisa é originário da Rússia, e obtido por meio da destilação a vapor das flores, com coloração amarelo claro e odor característico. Os Principais componentes são Acetato de linalila (38%) e Linalol (34%) (Anexo 1).

4.2.2 *Lavandula officinalis* Chaix

O óleo essencial de *Lavandula officinalis* é originário da França e Bulgária, e obtido por meio da destilação à vapor das flores, com coloração amarelo claro e odor característico. Ele é composto principalmente por Acetato de linalila (38%), Linalol (34%), Terpineno-4-ol (3%), cis β ocimene (1,5%) e Acetato de lavandulila (1%) (Anexo 2).

4.2.3 *Lavandula hybrida* E.Rev. ex Briq.

O óleo essencial de *Lavandula hybrida* (Lavandim) é originário da França e obtido por meio da destilação a vapor das flores, com coloração que vai do incolor até amarelo claro com odor alavandado com nata canforada. Esse óleo apresenta como principais componentes o Linalol (33%), Acetato de linalila (28%), Cânfora (7%), 1,8 – cineol (6%) e Borneol (3%) (Anexo 3).

4.3 Atividade do óleo essencial de *Lavandula angustifolia* sobre *Candida albicans*

Na tabela 1 observa-se a atividade do óleo essencial de *L. angustifolia* sobre isolados de *C. albicans*. Em 25% dos isolados (4/16) (1, 5, 7 e 13) foram sensíveis até a concentração de 1.315,6 $\mu\text{g/mL}$.

Os valores de CFM50 e CFM90, nos diferentes isolados foram 2.631,2 e 5.252,5 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente (Tabela 3).

Em relação à média e o desvio padrão da CFM do óleo essencial de *L. angustifolia* foi de $3.453,5 \pm 2.396\mu\text{g/mL}$. Os valores de Mediana, Mínima e Máxima apresentados foram de $2.631,3 \mu\text{g/mL}$, $1.315,6$ e $10.525\mu\text{g/mL}$ respectivamente (Tabela 4).

A pesquisa de tubo germinativo e clamidoconídio , após contato com o óleo essencial de *L. angustifolia*, na dose subinibitória manteve a formação de tubo germinativo e de clamidoconídios em todas as amostras (Tabela 1).

Morfologicamente, antes da atividade do óleo essencial ao 16 isolados apresentaram 8 morfotipos diferentes e, após o contato com o óleo essencial encontrou-se 11 morfotipos diferentes. O morfotipo 7540 em 3 isolados, foram mantidos, antes e após a atividade do óleo essencial (Tabela 2).

Tabela 1. Concentração Fungicida Mínima, formação de tubo germinativo e clamidoconídio, nos isolados biológicos de *C. albicans*, antes e após contato com óleo essencial de *Lavandula angustifolia*

<i>Lavandula angustifolia</i>	CFM*		Tubo germinativo	Tubo germinativo	Clamidoconídio	Clamidoconídio
	Isolados	µg/mL	% (v/v)**	Antes da atividade do óleo essencial	Após a atividade do óleo essencial	Antes da atividade do óleo essencial
1	1.315,6	0,78	Presente	Presente	Presente	Presente
2	10.525	6,25	Presente	Presente	Presente	Presente
3	2.631,2	1,56	Presente	Presente	Presente	Presente
4	2.631,2	1,56	Presente	Presente	Presente	Presente
5	1.315,6	0,78	Presente	Presente	Presente	Presente
6	2.631,2	1,56	Presente	Presente	Presente	Presente
7	1.315,6	0,78	Presente	Presente	Presente	Presente
8	5.252,5	3,12	Presente	Presente	Presente	Presente
9	2.631,2	1,56	Presente	Presente	Presente	Presente
10	2.631,2	1,56	Presente	Presente	Presente	Presente
11	5.252,5	3,12	Presente	Presente	Presente	Presente
12	5.252,5	3,12	Presente	Presente	Presente	Presente
13	1.315,6	0,78	Presente	Presente	Presente	Presente
14	2.631,2	1,56	Presente	Presente	Presente	Presente
15	5.252,5	3,12	Presente	Presente	Presente	Presente
16	5.252,5	3,12	Presente	Presente	Presente	Presente

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

*CFM: concentração fungicida mínima.

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

Tabela 2. Concentração Fungicida Mínima e morfotipos de *C. albicans* antes e após contato com óleo essencial de *Lavandula angustifolia*.

<i>Lavandula angustifolia</i>	CFM*		Morfotipos***	
	Isolados	µg/mL	% (v/v)**	Antes da atividade do óleo essencial
1	1.315,6	0,78	7340	5540
2	10.525	6,25	7540	7540
3	2.631,2	1,56	5336	7548
4	2.631,2	1,56	7540	7540
5	1.315,6	0,78	7546	7542
6	2.631,2	1,56	7540	7340
7	1.315,6	0,78	5341	5340
8	5.252,5	3,12	7540	5330
9	2.631,2	1,56	7540	5348
10	2.631,2	1,56	7540	5540
11	5.252,5	3,12	7538	7348
12	5.252,5	3,12	7340	6636
13	1.315,6	0,78	7540	7540
14	2.631,2	1,56	7248	7248
15	5.252,5	3,12	3548	7548
16	5.252,5	3,12	7340	7540

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

*CFM: concentração fungicida mínima.

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

***Código dos morfotipos de *C. albicans* conforme modelo de Pongpaichit1987- modificado por Hunter et al.,1989.

Tabela 3. Valores de CFM50 e CFM90 do óleo essencial de *Lavandula angustifolia* sobre isolados de *Candida albicans*.

Óleo essencial de <i>Lavandula angustifolia</i>	Concentração Fungicida Mínima (CFM)	
	CFM 50* µg/mL - % (v/v)***	CFM 90** µg/mL - % (v/v)
<i>Candida albicans</i>	2.631,2 - 1,56	5.252,5 - 3,12

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

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

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

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

Tabela 4. Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima do óleo essencial de *Lavandula angustifolia* sobre isolados biológicos de *Candida albicans*.

Óleo essencial de <i>Lavandula angustifolia</i>	Concentração Fungicida Mínima (CFM)	
	µg/mL	% (v/v)*
**µ ± dp	3.453,5 ± 2.396	2,05 ± 1,42
Mediana	2.631,3	1,56
Mínima – Máxima***	1.315,6 - 10.525	0,78 – 6,25

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

* v/v: volume por volume em porcentagem

**µ ± dp – Média e desvio padrão

***Min. – Mínima e Max. Máxima

4.4 Atividade do óleo essencial de *Lavandula officinalis* sobre *Candida albicans*

Na tabela 5 observa-se a atividade do óleo essencial de *L. officinalis* sobre isolados de *C. albicans*. Em 12,5% dos isolados (2/16) (5 e 6) foram sensíveis até a concentração de 1.315,6 µg/mL.

Os valores de CFM50 e CFM90, nos diferentes isolados foram 5.306,2 e 10.612 µg/mL respectivamente (Tabela 7).

Em relação à média e o desvio padrão da CFM do óleo essencial de *L. officinalis* foi de $6.467 \pm 5.191,7$ µg/mL. Os valores de Mediana, Mínima e Máxima apresentados foram de 5.306,2 µg/mL, 1.315,6 e 10.525 µg/mL respectivamente (Tabela 8).

A pesquisa de tubo germinativo e clamidoconídio , após contato com o óleo essencial de *L. officinalis*, na dose subinibitória manteve a formação de tubo germinativo e de clamidoconídios em todas as amostras (Tabela 5).

Morfologicamente, antes da atividade do óleo essencial ao 16 isolados apresentaram 5 morfotipos diferentes e, após o contato com o óleo essencial encontrou-se 8 morfotipos diferentes. Das cepas estudadas, 43,75% (7/16) apresentou alteração de morfotipo após a atividade do óleo essencial (Tabela 6).

Tabela 5. Concentração Fungicida Mínima, formação de tubo germinativo e clamidoconídio, nos isolados biológicos de *C. albicans*, antes e após contato com óleo essencial de *Lavandula officinalis*

<i>Lavandula officinalis</i>	CFM*		Tubo germinativo	Tubo germinativo	Clamidoconídio	Clamidoconídio
	Isolados	µg/mL	% (v/v)**	Antes da atividade do óleo essencial	Após a atividade do óleo essencial	Antes da atividade do óleo essencial
1	21.225	12,5	Presente	Presente	Presente	Presente
2	5.306,2	3,12	Presente	Presente	Presente	Presente
3	2.653	1,56	Presente	Presente	Presente	Presente
4	10.612	6,25	Presente	Presente	Presente	Presente
5	1.326	0,78	Presente	Presente	Presente	Presente
6	1.326	0,78	Presente	Presente	Presente	Presente
7	10.612	6,25	Presente	Presente	Presente	Presente
8	10.612	6,25	Presente	Presente	Presente	Presente
9	5.306,2	3,12	Presente	Presente	Presente	Presente
10	5.306,2	3,12	Presente	Presente	Presente	Presente
11	2.653	1,56	Presente	Presente	Presente	Presente
12	5.306,2	3,12	Presente	Presente	Presente	Presente
13	2.653	1,56	Presente	Presente	Presente	Presente
14	5.306,2	3,12	Presente	Presente	Presente	Presente
15	2.653	1,56	Presente	Presente	Presente	Presente
16	10.612	6,25	Presente	Presente	Presente	Presente

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

*CFM: concentração fungicida mínima.

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

Tabela 6. Concentração Fungicida Mínima e morfotipos de *C. albicans* antes e após contato com óleo essencial de *Lavandula officinalis*

<i>Lavandula officinalis</i>	CFM*		Morfotipos***	
	Isolados	µg/mL	% (v/v)**	Antes da atividade do óleo essencial
1	21.225	12,5	7540	7540
2	5.306,2	3,12	7540	7540
3	2.653	1,56	7318	7318
4	10.612	6,25	7540	5546
5	1.326	0,78	7520	7526
6	1.326	0,78	7540	5540
7	10.612	6,25	7340	7340
8	10.612	6,25	7340	3206
9	5.306,2	3,12	7340	5540
10	5.306,2	3,12	7540	7540
11	2.653	1,56	7540	7540
12	5.306,2	3,12	5340	5340
13	2.653	1,56	7540	5540
14	5.306,2	3,12	7340	7340
15	2.653	1,56	7540	7540
16	10.612	6,25	7540	5540

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

*CFM: concentração fungicida mínima.

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

***Código dos morfotipos de *C. albicans* conforme modelo de Pongpaichit1987- modificado por Hunter et al.,1989.

Tabela 7. Valores de CFM50 e CFM90 do óleo essencial de *Lavandula officinalis* sobre isolados de *Candida albicans*.

Óleo essencial de <i>Lavandula officinalis</i>	Concentração Fungicida Mínima (CFM)	
	CFM 50* µg/mL - % (v/v)**	CFM 90** µg/mL - % (v/v)
<i>Candida albicans</i>	5.306,2 - 3,12	10.612 - 6,25

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

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

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

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

Tabela 1. Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima do óleo essencial de *Lavandula officinalis* sobre isolados biológicos de *Candida albicans*.

Óleo essencial de <i>Lavandula officinalis</i>	Concentração Fungicida Mínima (CFM)	
	µg/mL	% (v/v)*
**µ ± dp	6.467± 5.191,7	3,81±3,06
Mediana	5.306,2	3,12
Mínima – Máxima**	1.326 - 21.225	0,78 – 12,5

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

* v/v: volume por volume em porcentagem

**µ ± dp – Média e desvio padrão

***Min. – Mínima e Max. Máxima

4.5 Atividade do óleo essencial de *Lavandula hybrida* sobre *Candida albicans*

No estudo com o óleo essencial de *Lavandula hybrida*, todos os isolados (16/16) apresentaram CFM de 2.664 µg/mL (1,56%). Ocorreu a formação do tubo germinativo e de clamidoconídios em todas as amostras (Tabela 9).

Na tabela 9 observa-se a atividade do óleo essencial de *L. hybrida* sobre isolados de *C. albicans*. Em 100% dos isolados (16/16) foram sensíveis até a concentração de 2.664µg/mL.

Os valores de CFM50 e CFM90, nos diferentes isolados foi de 2.664 µg/mL (Tabela11).

Em relação à média e o desvio padrão da CFM do óleo essencial de *L. hybrida* foi de 2.664±0,00 µg/mL. Os valores de Mediana, Mínima e Máxima apresentados foram de 2.664µg/mL (Tabela 12).

A pesquisa de tubo germinativo e clamidoconídio , após contato com o óleo essencial de *L. hybrida*, na dose subinibitória manteve a formação de tubo germinativo e de clamidoconídios em todas as amostras (Tabela 9).

Morfológicamente, antes da atividade do óleo essencial ao 16 isolados apresentaram 8 morfotipos diferentes e, após o contato com o óleo essencial encontrou-se 6 morfotipos diferentes. Os isolados 3, 7 e 16 foram os isolado que apresentaram alteração de morfotipo de 7548 para 5548, de 5540 para 7540 e de 5340 para 5540; respectivamente (Tabela 10).

Tabela 2. Concentração Fungicida Mínima, formação de tubo germinativo e clamidoconídio, nos isolados biológicos de *C. albicans*, antes e após contato com óleo essencial de *Lavandula hybrida*

<i>Lavandula hybrida</i>	CFM*		Tubo germinativo	Tubo germinativo	Clamidoconídio	Clamidoconídio
	µg/mL	% (v/v)**	Antes da atividade do óleo essencial	Após a atividade do óleo essencial	Antes da atividade do óleo essencial	Após a atividade do óleo essencial
1	2.664	1,56	Presente	Presente	Presente	Presente
2	2.664	1,56	Presente	Presente	Presente	Presente
3	2.664	1,56	Presente	Presente	Presente	Presente
4	2.664	1,56	Presente	Presente	Presente	Presente
5	2.664	1,56	Presente	Presente	Presente	Presente
6	2.664	1,56	Presente	Presente	Presente	Presente
7	2.664	1,56	Presente	Presente	Presente	Presente
8	2.664	1,56	Presente	Presente	Presente	Presente
9	2.664	1,56	Presente	Presente	Presente	Presente
10	2.664	1,56	Presente	Presente	Presente	Presente
11	2.664	1,56	Presente	Presente	Presente	Presente
12	2.664	1,56	Presente	Presente	Presente	Presente
13	2.664	1,56	Presente	Presente	Presente	Presente
14	2.664	1,56	Presente	Presente	Presente	Presente
15	2.664	1,56	Presente	Presente	Presente	Presente
16	2.664	1,56	Presente	Presente	Presente	Presente

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

*CFM: concentração fungicida mínima.

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

Tabela 10. Morfotipos dos isolados biológicos de *C. albicans* , antes e após contato com óleo essencial de *Lavandula hybrida*.

<i>Lavandula hybrida</i>	CFM*		Morfotipos***	
	Isolados	µg/mL	% (v/v)**	Antes da atividade do óleo essencial
1	2.664	1,56	7540	7540
2	2.664	1,56	7540	7540
3	2.664	1,56	7548	5548
4	2.664	1,56	7540	7540
5	2.664	1,56	5548	5548
6	2.664	1,56	5540	5540
7	2.664	1,56	5540	7540
8	2.664	1,56	5540	5540
9	2.664	1,56	7540	7540
10	2.664	1,56	7540	7540
11	2.664	1,56	7538	7538
12	2.664	1,56	5540	5540
13	2.664	1,56	7540	7540
14	2.664	1,56	7340	7340
15	2.664	1,56	7530	7530
16	2.664	1,56	5340	5540

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

*CFM: concentração fungicida mínima.

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

***Código dos morfotipos de *C. albicans* conforme modelo de Pongpaichit1987- modificado por Hunter et al.,1989.

Tabela 11. Valores de CFM50 e CFM90 do óleo essencial de *Lavandula hybrida* sobre isolados de *Candida albicans*.

Óleo essencial de <i>Lavandula hybrida</i>	Concentração Fungicida Mínima (CFM)	
	CFM 50* µg/mL - % (v/v)***	CFM 90** µg/mL - % (v/v)
<i>Candida albicans</i>	2.664 - 1,56	2.664 - 1,56

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

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

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

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

Tabela 12. Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima do óleo essencial de *Lavandula hybrida* sobre isolados biológicos de *Candida albicans*.

Óleo essencial de <i>Lavandula hybrida</i>	Concentração Fungicida Mínima (CFM)	
	µg/mL	% (v/v)*
**µ ± dp	2.664±0,00	1,56±0,00
Mediana	2.664	1,56
Mínima – Máxima***	2.664	1,56

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

* v/v: volume por volume em porcentagem

**µ ± dp – Média e desvio padrão

***Min. – Mínima e Max. Máxima

4.6 Valores de CFM 50 e CFM 90 dos óleos essenciais de *Lavandula angustifolia*, *Lavandula officinalis* e *Lavandula hybrida* sobre *C. albicans*

A Tabela 13 contém os valores CFM 50 e CFM 90 dos óleos essenciais de *L. angustifolia*, *L. officinalis* e *L. hybrida* sobre *Candida albicans*.

Tabela 13. Valores de CFM50 e CFM90 do óleo essencial de *Lavandula angustifolia*, *Lavandula officinalis* e *Lavandula hybrida* sobre isolados de *Candida albicans*.

<i>Candida albicans</i>	Concentração Fungicida Mínima (CFM)		
	Óleos essenciais	CFM 50* µg/mL - % (v/v)***	CFM 90** µg/mL - % (v/v)
	<i>Lavandula angustifolia</i>	2.631,2 - 1,56	5.252,5 - 3,12
	<i>Lavandula officinalis</i>	6.467± 5.191,7	10.612 - 6,25
	<i>Lavandula hybrida</i>	2.664 - 1,56	2.664 - 1,56

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

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

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

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

Dentre os óleos essenciais testados o óleo essencial de *L. hybrida* apresentou a menor concentração fungicida sobre os isolados de *C. albicans*. Linalol embora esteja presente nos três óleos essenciais testados ele é o composto majoritário em *L. hybrida* e por isso essa foi a substância testada sobre os isolados de *C. albicans*, quanto aos fatores de virulência, formação de tubo germinativo e a produção de franjas.

4.7 Atividade do composto químico majoritário linalol do óleo essencial de *Lavandula hybrida* sobre isolados de *C. albicans*

Na tabela 14 observa-se a atividade do composto químico majoritário linalol do óleo essencial de *L. hybrida* 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 composto químico majoritário linalol do óleo essencial de *L. hybrida* nos diferentes isolados foram 785,54µg/mL e 12.568µg/mL respectivamente (Tabela 15).

Em relação à média e o desvio padrão foi de 4482,04 ± 6667,98µg/mL. Os valores de mediana, mínima e máxima foram de 785,54µg/mL, 196,38µg/mL e 25137µg/mL respectivamente (Tabela 16).

A pesquisa de tubo germinativo, após contato com o composto químico majoritário linalol na dose subinibitória, em 100% (16/16) dos isolados a formação de tubo germinativo foi inibida (Tabela 14).

Alterações morfológicas ocorreram em 75% (12/16) dos isolados de *C. albicans*, em relação ao controle com inibição da produção de franjas (Tabela 14).

Tabela 14. Concentração Fungicida Mínima, formação de tubo germinativo e morfotipos sobre *Candida albicans* antes e após contato com o composto químico majoritário linalol do óleo essencial de *Lavandula hybrida*

Linalol	CFM		Tubo germinativo		Morfotipos***	
	CFM µg/mL	CFM %	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	12568	6,06	Presente	Ausente	5341	0001
2	6284	3,03	Presente	Ausente	5341	0000
3	785,54	0,37	Presente	Ausente	7341	0000
4	392,77	0,18	Presente	Ausente	5345	0001
5	785,54	0,37	Presente	Ausente	7346	1241
6	12568	6,06	Presente	Ausente	7541	0000
7	785,54	0,37	Presente	Ausente	5240	0001
8	25137	12,12	Presente	Ausente	1240	0001
9	785,54	0,37	Presente	Ausente	7341	1241
10	1571	0,75	Presente	Ausente	5341	0000
11	3142	1,51	Presente	Ausente	5341	0000
12	3142	1,51	Presente	Ausente	7241	0000
13	785,54	0,37	Presente	Ausente	1231	0000
14	196,38	0,094	Presente	Ausente	5541	5241
15	6284	3,03	Presente	Ausente	5240	5241
16	785,54	0,37	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 15. Valores de CFM 50 e CFM 90 do óleo essencial de *Lavandula hybrida* sobre os isolados de *C. albicans*.

Linalol	Concentração Fungicida Mínima (CFM)	
	CFM 50* µg/mL - % (v/v)***	CFM 90** µg/mL - % (v/v)
<i>Candida albicans</i>	785,54 - 0,37	12568 - 6,06

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

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

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

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

Tabela 16. Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima do composto químico majoritário linalol do óleo essencial de *Lavandula hybrida* sobre isolados biológicos de *Candida albicans*.

Linalol	Concentração Fungicida Mínima (CFM)	
	µg/mL	% (v/v)*
**µ ± dp	4482,04 ± 6667,98	2,15 ± 3,21
Mediana	785,54	0,37
Mínima – Máxima***	196,38 - 25137	0,094 - 12,12

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

* v/v: volume por volume em porcentagem

**µ ± dp – Média e desvio padrão

***Min. – Mínima e Max. Máxima .

5 DISCUSSÃO

Os óleos essenciais possuem uma vasta aplicação como: perfumaria, cosmética, alimentos e componentes coadjuvantes de medicamentos; utilizados na forma bruta ou componentes purificados como o eugenol, mentol, entre outros (Bizzo, 2009). Os óleos essenciais podem ser extraídos das diversas partes das plantas como folhas, flores e brotos, caules (a casca) e galhos, raízes, sementes e frutos (Bakkali et al., 2008). São misturas complexas, de inúmeras moléculas pertencentes ao metabolismo secundário das plantas e seus efeitos podem ser resultantes de um sinergismo entre diversas moléculas ou apenas daquelas presentes em maiores quantidades. É possível que a atividade dos componentes em grande quantidade seja modulada por outras moléculas menores; nesse sentido seria melhor estudar o óleo essencial por inteiro em vez de alguns dos seus componentes (Bakkali et al., 2008).

O metabolismo secundário pode ser influenciado, por fatores genéticos, climáticos (temperatura, intensidade de luz, efeito sazonal, etc.) e edáficos (Morais, 2009).

O método de extração depende da finalidade do uso do óleo essencial, como, por exemplo, para uso farmacêutico ou alimentar recomenda-se a extração por destilação a vapor, para a formulação de perfumes a extração é feita com solventes lipofílicos (Bizzo, 2009).

O óleo extraído pode apresentar alterações na atividade microbiana, qualidade e quantidade variável, devido a alterações genéticas existentes na espécie vegetal que podem alterar o teor do princípio ativo, o clima, a época e a forma de plantio, o solo, o órgão da planta, o tempo de vida e o estágio que se encontra o ciclo vegetativo assim como também a adubação, o uso de defensivos agrícolas (agrotóxicos), irrigação, tempo e condições ambientais, entre outros (Nascimento et al., 2007).

Ressaltam-se ainda, as interações planta/microrganismos, planta/insetos e planta/planta; idade e estágio de desenvolvimento, fatores abióticos como luminosidade, temperatura, pluviosidade, nutrição, época e horário de coleta, bem como técnicas de colheita e pós – colheita. Estes

fatores podem apresentar correlações entre si, não atuando isoladamente, podendo exercer influência conjunta no metabolismo secundário (Morais, 2009).

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 (CIM) do óleo essencial no inverno foi acima de 50 $\mu\text{g/mL}$, enquanto no verão foi maior que 100 $\mu\text{g/mL}$.

Além disso, outros fatores podem afetar a atividade antimicrobiana como as várias metodologias para detecção da concentração inibitórias mínima dos óleos essenciais frente aos microrganismos (Araújo, 2014). 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).

A escolha do método de microdiluição em caldo nesta pesquisa deve-se ao fato deste método ser de baixo custo, boa reprodutibilidade dos resultados, sem necessidade de equipamentos complexos para leitura, pois é feita visualmente e por ser mais sensível que outros métodos usados na literatura, requer pequena quantidade de óleos essenciais, assim como para seus respectivos compostos químicos majoritários testados. (Ostrosky et al., 2008; Castro e Lima, 2011; Cavalcante, Almeida e Padilha, 2011; Almeida et al., 2011; Bona et al., 2016).

Para uma boa qualidade das análises com óleos essenciais, tornou-se importante 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 ou fungistática. Já o uso do solvente DMSO o resultado foi de uma atividade fungicida a 25% v/v (2.500 µg/mL). Optando-se pelo tensoativo *Tween 20* para todos os ensaios realizados, uma vez que possui a menor concentração, fácil homogeneização no meio de cultura e por não apresentar atividade fungicida. Nascimento et al., (2007).

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 *Lavandula angustifolia*, *Lavandula officinalis* e *Lavandula hybrida* todos da família Lamiaceae e que apresentam diversas atividades como antioxidantes, calmantes, analgésicas, antimicrobiana, antifúngica e inseticida (relato de atuação no desenvolvimento de larva e pupa) (Salehi et al., 2018).

Uma questão abordada nos estudos sobre óleos essenciais de plantas do gênero *Lavandula* é a carência de informações na própria literatura (Ali-Shtayeh, 2020). Outra questão na literatura está no gênero *Lavandula* que apresenta uma variedade de sinônimos para uma mesma espécie, isso está relacionado ao fato de que a espécie não está totalmente compreendida (Lis-Balchin, 2002). No estudo de Sicak et al. (2019), a *L. angustifolia* e *L. officinalis* são citadas como espécies diferentes. Para outros autores as espécies *L. angustifolia* e *L. officinalis* são sinônimos (Robu et al., 2016; Demasi et al., 2018; Salehi et al., 2018 e Lyczko et al., 2019;), demais autores relataram apenas uma espécie: *L. angustifolia* (Radulescu et al., 2019 e Behmanesh et al., 2015) ou *L. officinalis* (Perovic et al., 2019).

Com aproximadamente 39 espécies e diversos híbridos, a *Lavandula* é economicamente interessante para o mercado de fragrâncias e na indústria

farmacêutica (Salehi et al., 2018), ela é amplamente usada na perfumaria e cosmética, e muito utilizada para a “aromaterapia” na qual as suas flores secas são usadas em travesseiros e saquinhos para promover o sono e relaxamento. Essa planta é usada desde a era vitoriana sendo a espécie *L. angustifolia* a principal variedade presente em óleos essenciais e perfumes e as suas flores são vendidas como plantas ornamentais dentre elas estão também às espécies: *L. latifolia*, *L. pinnata*, *L. lanata*, *L. dentata* e *L. stoechas* (Lis-Balchin, 2002).

A *Lavandula* é comercialmente cultivada em diversos países, principalmente na França, Reino Unido, Bulgária, Itália, Hungria, Austrália, China, Rússia e Índia (nesse último país, obteve-se o sucesso do cultivo nos anos 80), cresce em quintais, vasos e recipientes. Na planta, o óleo é produzido em tricomas (projeções da epiderme) glandulares na superfície das flores e das folhas apresenta componentes variados como linalol, acetato de linalila, 1,8-cineol, β -ocimeno, terpineno-4-ol e cânfora, além de β -cariofileno e nerolidol; e outros compostos como, por exemplo, álcool perílico (Salehi et al., 2018).

O cultivo da *Lavandula* não exige muitos cuidados, cresce em solos pobres, com baixa fertilidade natural e rochosos. Resistentes a secas e temperaturas baixas. A produção dos óleos essenciais, podem ficar comprometida se a planta for cultivada em locais com alta incidência de ventos e alta temperatura. Considerada uma planta de “dia longo” a *Lavandula* floresce na primavera e verão quando há uma incidência de iluminação de 12 às 14h diárias, e o horário da colheita das flores para a produção do óleo essencial deve ser no início da manhã para manter a qualidade e quantidade do produto ao evitar a exposição ao sol. No Brasil o cultivo é pouco comum restrito à região Sul com colheitas entre os meses de julho a setembro (Adamuchio, Deschamps, Machado; 2017).

Os óleos essenciais com maior importância econômica são das espécies: Lavanda Verdadeira (ou genuína) (sinônimos. *L. officinalis* Chaix.; *L. vera* DC; *L. angustifolia* Mill.), Lavanda “Spike” (espiga) (sinônimos *L.*

latifolia Mill.; *L. spica* DC) e Lavandim (sinônimos *L. hybrida* Revr; *L. intermedia* Emeric.) (Salehi et al., 2018).

Nesta pesquisa foram utilizados 16 isolados biológicos 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. Na reidentificação todos os isolados apresentaram tubo germinativo e baseando-se especialmente nas diferenças de produção e extensão de franjas das colônias, nesta pesquisa obteve-se morfotipos com franjas contínuas com filamentos paralelos (7) e morfotipos com franjas contínua, 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).

Estima-se que a candidíase invasiva afete aproximadamente 700.000 pessoas, sendo a candidíase bucal e esofágica predominante em até 90% dos indivíduos com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), não tratados com a terapia antirretroviral (TARV) e naqueles com contagem de CD4 menor que 200, em aproximadamente 20% dos indivíduos e em cerca de 5% nos tratados com o terapia antirretroviral (TARV) (Bongomin et al., 2017).

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

Outras propriedades dessa levedura no processo patogênico é a formação de hifas e pseudohifas, como mecanismo de escape a fagocitose (Samaranayake, 1990; Gacser et al., 2007 Martins et al., 2015 e Santana et al., 2013). O progresso da infecção está relacionado a uma combinação de fatores como virulência da cepa e desordens imunológicas do hospedeiro

(Furlamento-Maia et al., 2008; Grubb et al., 2009; Rorig e Colacite, 2009; Pupulin, 2014).

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 sementeira de isolados, em meio de ágar extrato de malte, Phonpaichit et al, (1987), geraram um código de sete dígitos que teoricamente permitia a produção de 100 morfotipos diferentes. Estes autores encontraram um índice de reprodutibilidade de 84% para os isolados idênticos e de 96% para o morfotipo que diferiria em um caractere. Hunter et al., (1989) sugerem que este sistema pode correlacionar um morfotipo distinto com a capacidade de virulência, onde franjas descontínuas estão presentes geralmente em isolados de infecção sistêmica fatais. Silva, (2003) observou franjas maiores que 3 mm em 86,5% dos isolados de pacientes com AIDS, enquanto 42,9% dos isolados de indivíduos HIV negativos não apresentaram franjas.

Atualmente, a ocorrência de resistência a antifúngicos é o maior desafio para o sucesso do tratamento em casos de candidíase, sobretudo a forma invasiva. Devido à capacidade adaptativa do gênero *Candida*, frequentemente atribui-se o surgimento de cepas resistentes a diversos agentes antifúngicos, inclusive anfotericina B, considerada o padrão-ouro em diversos tratamentos (Fisher et al., 2018; Krishnasamy et al., 2018; Legrand et al., 2019).

Na busca de novas alternativas terapêuticas eficazes, seguras e de baixo custo, com atividade antifúngica especialmente sobre *C. albicans*, utilizou-se nesta pesquisa os três óleos essenciais e um composto químico majoritário.

Os óleos essenciais estudados nesse trabalho foram *Lavandula augustifolia*, *Lavandula officinalis* e *Lavandula hybrida* todos da família

Lamiaceae e que apresentaram atividade antimicrobiana sobre os isolados de *C. albicans*.

Quanto a formação de tubos germinativos todos os isolados apresentaram esta estrutura antes e após contato com os três óleos essenciais.

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%.

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, os óleos também não afetaram 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. (1998) 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. Neste estudo as menores concentrações inibitórias foi conseguida com a *L. hybrida*, mas bem acima desse valor.

Os compostos químicos principais e mais comumente encontrados no óleo essencial de *L. hybrida* incluem o Linalol(33%), Acetato de Linalila (29%), Cânfora (7%), Eucaliptol (1,8-cineol) (6%), Borneol (3%), Acetato de lavandulila (2%), trans-β-ocimeno (2%), cis-β-ocimeno (1%), Lavandulol (05%) e Terpineno-4-ol (0,2%). Segundo Sautour (2004) a atividade antimicrobiana é significativa quando os resultados atingem valores < 200 µg/mL para compostos químicos isolados.

O linalol é um monoterpeneo de extrema importância para as indústrias de cosméticos e alimentícios, já que é utilizado, como fixador de fragrâncias (Bakkali et al., 2008). Também é utilizado com sucesso como sedativo e propriedades anticonvulsivas, hipnóticas, hipotérmicas e efeito depressor do sistema nervoso central estão sendo analisadas, assim como as propriedades acaricidas, bactericida e fungicida. (Julião et al., 2003, Luz et al., 2009).

No que se refere à toxicidade do linalol a dose letal é baixa, quando comparada a outros constituintes dos óleos essenciais, tornando-se, por este motivo, alvo de estudos para aplicabilidade terapêutica. As pesquisas dos efeitos tóxicos das substâncias estão relacionadas com via de administração, tempo, duração e frequência da dose, o que foi demonstrado por Venâncio (2006). O linalol apresentou baixa toxicidade aguda em vários modelos experimentais e com diferentes vias de administração (Bickers et al., 2003).

Linalol age no sistema sensorial somático bloqueando canais de sódio dependente de voltagem em nervo ciático de ratos (Cardoso et al., 2010), como também em nervos ciático de rãs (Zalachoras et al., 2010).

Outros efeitos também foram listados para o linalol tais como: anti-leishmaniose (Rosa et al., 2003) e antimicrobiano, podendo ser utilizado no combate aos microrganismos causadores de infecções hospitalares, principalmente em pacientes imunocomprometidos, destacando-se neste grupo os portadores de HIV e transplantados (Alviano et al., 2005).

Como antifúngico, Hsu et al. (2013) pesquisou linalol sobre o crescimento de biofilme de *C. albicans*, indicando que o linalol pode ter potencial terapêutico no tratamento de candidíase associada a dispositivos médicos pois interfere com a morfologia e modifica a formação de biofilme de *C. albicans*.

Neste estudo, o Linalol apresentou atividade fungicida sobre os isolados de *C. albicans*. e inibiram a formação de tubo germinativo e a produção de franjas.

Nas *Lavandulas* o linalol e o acetato de linalila são os principais componentes encontrados no óleo essencial feito das flores da *L. angustifolia* e nas folhas os principais componentes encontrados nos óleos essenciais são

o eucaliptol (1,8-cineol), cânfora e borneol. A secagem é a etapa mais significativa, no qual, dependendo do método, pode resultar na perda de alguns constituintes voláteis e até na alteração da cor (Lyczko et al., 2019).

De acordo com Lyczko et al. (2019), os métodos de secagem e a volatilidade dos compostos afetam a composição do produto final, podendo diminuir a participação da cânfora e ao mesmo tempo aumentando a participação dos compostos linalol e acetato de linalila que são os componentes mais desejáveis para o aroma da Lavanda.

Lis-Balchin. 2002 relatou que a *Lavandula* possui baixa toxicidade e o uso do óleo essencial sem diluição foi utilizado para o tratamento de queimaduras, embora tenha sido relatado casos de alergia pelo contato aéreo.

Estudos envolvendo a atividade antimicrobiana da *Lavandula* consistem em experimentos utilizando uma espécie de *Lavandula*, ou amostras de *Lavandula* de diferentes de regiões sobre *C. albicans* (Ali-Shtayeh et al., 2020). Estudos sobre a atividade fungicida também ocorreu sobre outras espécies de leveduras *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilopsis*, *Cryptococcus neoformans*, quanto em fungos filamentosos como as espécies, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton verrucosum* e *Microsporum gypseum*. (Zuzarte et al., 2011 e 2012).

O estudo realizado por D`Auria et al. (2005), mostrou que o óleo de *Lavandula* em baixas concentrações (1-2%) tem propriedades fungicidas em até 100% das amostras contra a *C. albicans* inibindo o crescimento do tubo germinativo e também reduzindo o alongamento de hifas, em baixas concentrações do óleo. Segundo esse estudo, isso permite a redução da progressão fúngica e a disseminação da infecção. Para isso testou o óleo essencial de *L. angustifolia*, os componentes isolados Linalol e Acetato de linalila, a partir do método de microdiluição em concentrações de 0,0078 – 4% e, determinaram a CIM correspondente a completa inibição do crescimento do tubo germinativo. Os componentes majoritários foram o linalol (32,75%) e o

Acetato de linalila (43,13%). Dos compostos isolados o Linalol inibiu 100% das células numa concentração de 0,5% em 30 segundos e o Acetato de linalila numa concentração de 2% inibiu 93% das células em 30 minutos. Neste estudo o óleo essencial de *L. angustifolia* inibiu 90% das leveduras na concentração 5.252,5 µL/mL mas não inibiu a formação de tubo germinativo e nem a produção de franjas nas doses subinibitórias.

O óleo essencial de *L. officinalis* colhida em Montenegro, apresentou atividade sobre *C. albicans* a partir do método de diluição em caldo onde as cepas foram preparadas numa concentração de 2×10^5 UFC/mL no Sabouraud dextrose. A CIM foi de 1,4 µL/mL, e os seus componentes majoritários foram o Acetato de linalila (22,39%), o 1,8-cineol (18,13%), canfora (12,88%) (considerado em maior quantidade do que o encontrado e outros estudos) e borneol (3,02%) (Perovic et al.; 2019). Neste estudo o óleo essencial de *L. officinalis* inibiu 90% das leveduras na concentração de 10.612 µL/mL mas não inibiu a formação de tubo germinativo e nem a produção de franjas nas doses subinibitórias.

Nos estudos envolvendo a atividade fungicida das espécies de *Lavandula*, afirmaram que os componentes majoritários poderiam ser os responsáveis pela atividade antifúngica (Behmanesh et al., 2015; Robu et al., 2016 e Ali-Shtayeh et al., 2020). Segundo Zuzarte et al. (2011), acredita-se que seja difícil atribuir atividade fungicida a apenas um único composto e os componentes encontrados em menores quantidades também podem ser fundamentais para a atividade do óleo essencial. A metodologia usada é variada e neste estudo a atividade fungicida sobre a *C. albicans* foi determinada pela técnica microdiluição. (D'Auria et al., 2005 e Sicak et al., 2019).

Na literatura, diversos autores concluem que os resultados envolvendo a atividade da *Lavandula* sobre *C. albicans* pode ser considerada uma alternativa para uma possível aplicação clínica (D'auria et al., 2005; Zuzarte et al., 2011 e 2012; e Ali-Shtayeh, 2020) e principalmente, um indicativo para pesquisas futuras (Zuzarte et al., 2012; Behmanesh et al., 2015; Radulescu et al., 2019 e Sicak et al., 2019).

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 *Lavandula augustifolia*, *Lavandula officinalis* e *Lavandula hybrida* estudados apresentaram atividade fungicida sobre isolados biológicos de *Candida albicans*.
- O óleo essencial de *L. hybrida* foi o que apresentou a menor concentração fungicida sobre os isolados de *C. albicans*.
- Nas doses subinibitórias os óleos essenciais de *L. augustifolia*, *L. officinalis* e *L. hybrida* não inibiram a formação de tubo germinativo, clamidoconídeo e não alteraram a produção de franjas.
- O composto químico majoritário linalol do óleo essencial de *L. hybrida* apresentou atividade fungicida sobre os isolados de *C. albicans*, bem como inibiram a formação de tubo germinativo e a produção de franja.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Adamuchio LG, Deschamps C, Machado MP. Aspectos gerais sobre a cultura da Lavanda (*Lavandula* spp.). Rev. Bras. Pl. Med., São Paulo. 2017; 19 (4); 483-490.

Ali-Shtayeh MS, Abu-Zaitoun SY, Dudai N, Jamous RM. Downy Lavender Oil: A Promising Source of Antimicrobial, Antiobesity, and Anti-Alzheimer's Disease Agents. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2020; 10 p. <https://doi.org/10.1155/2020/5679408>

Al-Maskri, MA Hanif, MY Al-Maskari Essential Oil from *Ocimum basilicum* (Omani Basil): A Desert Crop. Natural product communications. 2011; 6(10):1487-90 DOI: 10.1177/1934578X1100601020

Almeida LFD. Screening da Atividade Antifúngica de Óleos Essenciais sobre *Candida Albicans*. Revista Brasileira de Ciências da Saúde. 2011; 14 (4); 51-56;

Alviano WS, Mendonça-Filho RR, Alviano DS, Bizzo HR, Souto-Padrón T, Rodrigues ML, et al. Antimicrobial activity of *Croton cajucara* Benth linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. Oral Microbiology and Immunology. 2005; 20(2):101-5. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2004.00201.x>

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 de óleos essenciais sobre *Candida albicans* e seus fatores de virulência [Dissertação]. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças – Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2015.

Arendrup MC, Dzajic E, Jensen RH, Johansen HK, Kjældgaard P, Knudsen JD, et al. Mudanças epidemiológicas com implicação potencial para recomendações de prescrição de antifúngicos para fungemia: Dados de um programa nacional de vigilância de fungemia. *Clin. Microbiol. Infectar*. 2013 , 19 .

Bakkali, F. et al.. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 2008; 46; 446–475.

Behmanesh, F.. et al. Antifungal Effect of Lavender Essential Oil (*Lavandula angustifolia*) and Clotrimazole on *Candida albicans*: An *In Vitro* Study. *Scientifica*. 2015; 5 p.

Berkow E, Lockhart SR. Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. *Infection and Drug Resistance*. 2017; 10, 237-245.

Bickers, D A toxicologic and dermatologic assessment of linalool and related esters when used as fragrance ingredients. *Food and Chemical Toxicology*. 2003; 41(7):919-42; DOI: 10.1016/S0278-6915(03)00016-4

Bizzo, H. R.. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Quim. Nova*, 2009; 32 (3), 588-594.

Bona, E. et al. Sensitivity of *Candida albicans* to essential oils: are they an alternative to antifungal agents? *Journal of Applied Microbiology*. 2016; 121 (6), 1530 - 1545.

Bongomin, F. et al. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases Estimate Precision. *J. Fungi*. 2017; 57 (3), 29.

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

Cardoso JHL, Lahlou S. 1-Nitro-2-phenylethane, the main constituent of the essential oil of Aniba canelilla, elicits a vago-vagal bradycardiac and depressor reflex in normotensive rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2010; 638: 90-98.

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

Castro, R.D.; Lima, E.O.. Atividade antifúngica dos óleos essenciais de sassafrás (*Ocotea odorifera Vell.*) e alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*) sobre o gênero *Candida*. *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu*, 2011; 13.(2), 203-208.

Cavalcanti YW, Almeida FD, Padilha WWN. Atividade Antifúngica de Três Óleos Essenciais Sobre Cepas de *Candida* *Rev Odontol Bras Central*, 2011; 20 (52), 68 - 73.

Cavanagh HMA, Wilkinson JM. Biological activities of lavender essential oil. *Phytother Res.* 2002;16:301-8

Cavanagh HMA, Wilkinson JM. Lavender essential oil: a review. *Austr Infect Control.* 2005;10(1):35-7.

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 W. *Candida albicans* Cell Wall Proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 2008; 72 (3), 495-544.

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.

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

Daferera DJ, Ziogas BN, Polissiou MG. GC-MS analysis of essential oils from some greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. J Agric Food Chem. 2000;48:2576-81.

D'Auria, F. et al. Antifungal activity of *Lavandula angustifolia* essential oil against *Candida albicans* yeast and mycelial form. Medical Mycology. 2005; 43 (5), 391-396.

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.

Dismukes, W. E. Introduction to Antifungal Drugs, Clinical Infectious Diseases. Abr.: 2000; 30, 653-657.

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

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

Fisher MC, Hawkins NJ, Sanglard D, Gurr SJ. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. Science. 2018; 360(6390):739–42. DOI: 10.1126/science.aap7999

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

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

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

Gazim, Z. C. *et al.*. Antifungal activity of the essential oil from *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) growing in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2008; 39, 61-63.

Giacomazzi J, Baethgen L, Carneiro LC, Millington MA, Denning DW, Colombo AL, Pasqualotto AC; Association With The LIFE Program. The burden of serious human fungal infections in Brazil. *Mycoses.* 2016; 59(3):145-50. 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.

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

Global Action Fund for Fungal Infections (GAFFI). Priority Fungal Infections. Available online: <http://www.gaffi.org/media/fact-sheets/2017> [acesso em 10 dezembro de 2020].

Gobbo-Neto L, Lopes NP. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova.* 2007; v.30, n.2, p. 374-81.

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

Hamdy, R. *et al.*. Essential oil-based design and development of novel anti-*Candida* azoles formulation. *Molecules.*2020; 25:17.

Hsu CC, Lai WL, Chuang KC, Lee Mh, Tsai YC. The inhibitory activity of linalool against the filamentous growth and biofilm formation in *Candida albicans*. *Medical Mycology*. 2013; 51, 473–482.

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

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

Ipek E, Zeytinoglu H, Okay S, Tuylu BA, Kurkcuoglu M, Husnu Can Baser K. Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. *Food Chem*. 2005; 93: 551–556

Julião, LS. Cromatografia em camada fina de extratos de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) N.E.Br. (erva-cidreira) *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2003;13 DOI: 10.1590/S0102-695X2003000300014

Karpiński, Tomasz M. “Essential Oils of Lamiaceae Family Plants as Antifungals.” *Biomolecules*. 2020; 10,(1) 103 - 7 , doi:10.3390/biom10010103

Krishnasamy, L. et al.. Molecular mechanisms of antifungal drug resistance in *Candida* species. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2018; 12 (9), 6.

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. P. et al. Methods for Isolation, Phenotypic Characterization and Maintenance of Yeasts. In: Kurtzman, C. P.; Fell, J. W.; Boekhout, T. (eds).

The Yeasts: a taxonomic study. 5^a ed. Califórnia: Elsevier, cap-7, 2011; p. 87-110.

Lavare. In: MICHAELIS: dicionário escolar italiano: italiano – português, português – italiano. Polito, André Guilherme. 2^a ed. São Paulo: Editora Melhoramentos, 2009.

Legrand et al. *Candida albicans*: An Emerging Yeast Model to Study Eukaryotic Genome Plasticity. Trends Genet. Abr.: 2019; 35 (4), p. 292-307.

Lima, I. O. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. Braz J. Pharmacognosy. 2006; 16 (2), 197-201.

Lima, R. K; Cardoso, M. G.. Família Lamiaceae: Importantes Óleos Essenciais com Ação Biológica e Antioxidante. Revista Fitos. 2007; 3 (3), 14-24.

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

Lis-Balchin, M. (Ed). Lavender: The genus *Lavandula* Londres e Nova York; 2002; 283 p.

Luz JMQ, Morais TPS, Blank AF, Sodré ACB, Oliveira GS. Teor, rendimento e composi o química do óleo essencial de manjeriço sob doses de cama de frango. Horticultura Brasileira. 2009; 27(3): 349-353.

Lyczko J, Jaloszynski K, Surma M, Masztalerz K, Szumny A. HS-SPME Analysis of True Lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) Leaves Treated by

Various Drying Methods. *Molecules*. 2019; 764 (24), 13.
<https://doi.org/10.3390/molecules24040764>

Martins N, Barros L, Henriques M, Silva S, Ferreira ICFR. Activity of phenolic compounds from plant origin against *Candida* species. *Industrial Crops and Products*. 2015; 74, 648-70. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.067>

Naglik JR, Gaffen SL, Hube B. Candidalysin: discovery and function in *Candida albicans* infections. *Curr Opin Microbiol*. 2019; 52: 100-109.
doi:10.1016/j.mib.2019.06.002

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

Navarro-Arias MJ, Hernández-Chávez MJ, Garcia-Carnero LC, Amezcua-Hernández DG, Lozoya-Pérez NE, Martínez-Duncke 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.

Nazzaro F, Fratianni F, Coppola R, De Feo V. Essential Oils and Antifungal Activity. *Pharmaceuticals*. 2017; 10 (86), 20.
<https://doi.org/10.3390/ph10040086>

Nodoricypaye 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>

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

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.

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 .

Perovic S, Pantovic S, Scepanovic V, Perovic A, Zivkovic V, Vratnica BD. Evaluation of antimicrobial activity and activity on the autonomic nervous system of the lavender essential oils from Montenegro. Progress in Nutrition. 2019; 21 (3), 584-590.

Phongpaichi S, Mackenzie DWR, Fraser C. Strain differentiation of *Candida albicans* by morphotyping. *Epidem.Inf.*1987; 99: 421-428.

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.

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

Radulescu DE, Popescu A, Danila A, Chirila L, Muresan EI. Bioactivity and dermal toxicity of skin care textiles. 19th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM, Section Micro and Nano Technologies ; 2019; 19(6).1. DOI:10.5593/sgem2019/6.1/S24.007

Robu S, Chesaru BI, Diaconu C, Dimitriu-Buzia O, Tutunary D, Stănescu U, et al. *Lavandula hybrida*: microscopic characterization and the evaluation of the essential oil. *Farmacia*. 2016; 64 (6), 914-7.

Roller S, Ernest N, Buckle J. The antimicrobial activity of high necrodane and other lavender oils on methicilin-sensitive and -resistant *Staphylococcus aureus* (MSSA and MRSA). *J Altern Complement Med*. 2009;15(3):275-9.

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

Rosa MSS, et al. Antileishmanial Activity of a Linalool-Rich Essential Oil from *Croton cajucara*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003; 47(6): 1895-901,

Ruiz LS, Sugizaki MF, Montelli AC, Matsumoto FE, Pires MFC, Silva D. et al. 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.

Salehi B, Mnayer D, Özçelik B, Altin G, Kasapoglu N, Daskaya-Dikmen, et al. Plants of the genus *Lavandula*: from farm to pharmacy. Natural Product Communications. 2018; 13 (10), 1385-1402. <https://doi.org/10.1177/1934578X1801301037>

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

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

Sangwan NS, Farooqi AHA, Shabi F, Sangwan RS. Regulation of essential oil production in plants. Plant Growth Regulation. 2001; 34(1): 3-21.

Santana, D. P. et al. Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. Rev. Ciênc. Méd. Biol., Salvador, 2013; 12 (2), 229-233.

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

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

Satoh 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.

Sautour M, Mitaine-Offer AC, Miyamoto T, Dongmo A, Lecaille-Dubois MA. Antifungal Steroid Saponins from *Dioscorea cayenensis*. *Planta Médica* 2004; 70:90-92.

Shabaan AE, Elbaz LM, El-Emshaty WM, Shouman B. Role of serum (1,3)- β -d-glucan assay in early diagnosis of invasive fungal infections in a neonatal intensive care unit. *Jornal de Pediatria, Rio de Janeiro*, 2018; 94 (5), 559-65. <https://doi.org/10.1016/j.jpedp.2017.07.007>

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; 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 β -pinene enhances its in vitro antifungal activity against plant pathogens. *Molecules*. 2019;24:31-44. doi: 10.3390/molecules24173144

Sıcak Y, Eliuz EAE, Basaram E, Ulusoy H. Inhibition and Antimicrobial Activity of *Lavandula stoechas* Essential Oil on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. 4th International Symposium on Innovative Approaches in Engineering and Natural Sciences ISAS WINTER-2019, Samsun, Turke. 2019; 4(6): 485-9. <https://doi.org/10.36287/sets.4.6.135>

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.

Silva CB, Guterres SS, Weisheimer V, Schapoval EES. Antifungal Activity of the Lemongrass Oil and Citral Against *Candida* spp. The Brazilian Journal of Infectious Diseases. 2008; 12 (1), 63-66. <https://doi.org/10.1590/S1413-86702008000100014>

Silva MFS, Paiva J. Teosfrato, História das Plantas. Tradução Portuguesa, com Introdução e Anotação. Imprensa da Universidade de Coimbra. 2016.

Staniszewska M. Virulence Factors in *Candida* species. Curr Protein Pept Sci. 2020; 21(3): 313-323. doi:10.2174/1389203720666190722152415.

Toledo VS. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Malaleuca 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.

Venâncio AM. Toxicidade aguda e atividade antinociceptiva do óleo essencial do *Ocimum basilium* L. (manjeriçã), em *Mus musculus* (camundongos). Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Sergipe, Aracajú, 2006.

Williams DS, Kuriyama T, Silva S, Malic SC, Lewis MAO. *Candida* biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. Periodontology 2000. Singapura. 2011; 55, 250–265.

Zalachora, I, Kagiava A, Vokou D, Theophilidis G. Assessing the Local Anesthetic Effect of Five Essential Oil Constituents. Planta Med.2010.

Zuzarte M, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Canhoto J, Vale-Silva L, Silva MJ. et al.. Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Lavandula viridis* L'He´ r. Journal of Medical Microbiology. 2011; 60, 612–618.

Zuzarte M, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Canhoto J, Vaz S, et al. *Lavandula luisieri* essential oil as a source of antifungal drugs. Food Chemistry. 2012; 135, 1505–1510. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.090>

ANEXOS

Anexo 1: Principais componentes do óleo essencial de *Lavandula angustifolia* - Ferquima® (*)



FERQUIMA

LAUDO TÉCNICO Óleo Essencial de Lavanda Russa (*Lavandula angustifolia*)

Lote: 235	CAS Number: 8000-28-0
Fabricação: Julho/2018	Validade: Julho/2020

Itens Controlados	Resultados	Especificações
Aparência	Líquido Límpido	Líquido Límpido
Cor	Amarelo Claro	Amarelo Claro
Impurezas	Isento	Isento
Odor	Característico	Característico
Densidade (20°C)	0,880	0,875 – 0,890
Índice de Refração (20°C)	1,463	1,450 – 1,470
Rotação Ótica	-10°	[-12° ; -7°]
Data da Análise	24/09/2018	
Origem	Rússia	
Resultado	Aprovado	
Extração	Destilação a vapor das flores	
Principais componentes (valores aproximados)	Linalol = 34% Terpineno-4-ol = 3% Cis beta ocimene = 3%	Acetato de linalila = 39% beta cariofileno = 4% Acetato de lavandulila = 2%
Obs.: não contem OGM nem foi utilizado para teste em animais.		

Recomendações Especiais	
Manuseio	Não ingerir. Evitar contato com olhos e mucosa. Se isso ocorrer, lavar imediatamente com água límpida em abundância. Em caso de derramamento, absorver o material derramado com material absorvente (areia, terra).
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. Ponto de Fulgor: 69°C.
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: 90 / Número da ONU: 3082 / Classe ou Subclasse de risco: 9 / Descrição da 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

Anexo 2: Principais componentes do óleo essencial de *Lavandula officinalis* - Ferquima® (*)



LAUDO TÉCNICO
Óleo Essencial de Lavanda
(*Lavandula officinalis*)

Lote: 252	CAS Number: 84776-65-8
Fabricação: Julho/2018	Validade: Julho/2020

Itens Controlados	Resultados	Especificações
Aparência	Líquido Limpido	Líquido Limpido
Cor	Amarelo Claro	Amarelo Claro
Impurezas	Isento	Isento
Odor	Característico	Característico
Densidade (20°C)	0,890	0,880 – 0,900
Índice de Refração (20°C)	1,461	1,450 – 1,470
Rotação Ótica	-7,00°	[-10° ; -4°]
Data da Análise	24/09/2018	
Resultado	Aprovado	
Origem	Bulgária	
Extração	Destilação a vapor das flores	
Principais Componentes (valores aproximados)	Linalol = 30% Terpineno-4-ol = 2% Cis beta ocimene = 2%	Acetato de linalila = 40% beta cariofileno = 4% Acetato de lavandulila = 3%
Obs.: não contem OGM nem foi utilizado para teste em animais.		
Este produto é 100% puro, isento de solvente e diluente e segundo a RDC 481/99, não suscetível a contaminação microbiológica.		

Recomendações Especiais	
Manuseio	Não ingerir. Evitar contato com 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).
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. Flash point = 71°C
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: 90 / Número da ONU: 3082 / Classe ou Subclasse de risco: 9 / Descrição da 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

Anexo 3: Principais componentes do óleo essencial de *Lavandula hybrida* - Ferquima® (*)



LAUDO TÉCNICO
Óleo Essencial de Lavandim
(Lavandula hybrida)

Lote: 158	CAS Number: 8022-15-9
Fabricação: Julho/2018	Validade: Julho/2020

Itens Controlados	Resultados	Especificações
Aparência	Líquido Límpido	Líquido Límpido
Cor	Amarelo Palha	Incolor a Amarelo Palha
Impurezas	Isento	Isento
Odor	Alavandado com nota Canforada	Alavandado com nota Canforada
Densidade (20°C)	0,896	0,885 – 0,915
Índice de Refração (20°C)	1,461	1,450 – 1,470
Rotação Ótica	-2,40°	[-9° ; -2°]
Data da Análise	10/08/2018	
Resultado	Aprovado	
Origem	França	
Extração	Destilação a vapor das flores	
Principais Componentes (% aprox.)	Linalol = 33% Cânfora = 7% Borneol = 3%	Acetato de Linalila = 28% Eucaliptol = 6%
Obs.: não contem OGM nem foi utilizado para teste em animais.		
Este produto é 100% puro, isento de solvente e diluente e segundo a RDC 481/99, não suscetível a contaminação microbiológica.		

Recomendações Especiais	
Manuseio	Perigos mínimos. Não ingerir. Evitar contato com olhos e mucosa. Se isso ocorrer, lavar imediatamente com água límpida em abundância. Em caso de derramamento, absorver o material derramado com material absorvente (areia, terra).
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. Flash Point = 75°C.
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:90 / Número da ONU:3082 / Classe ou Subclasse de risco: 9 / Descrição da 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