

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**ATIVIDADE *in vitro* DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE
CONDIMENTOS FRENTE A *Candida glabrata*
SENSÍVEIS E RESISTENTES AO FLUCONAZOL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Isaura Helena Soares

**Santa Maria, RS, Brasil
2012**

**ATIVIDADE *in vitro* DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE
CONDIMENTOS FRENTE A *Candida glabrata* SENSÍVEIS E
RESISTENTES AO FLUCONAZOL**

por

Isaura Helena Soares

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle da Qualidade e Avaliação Biofarmacêutica de Insumos e Medicamentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**

Orientador: Sydney Hartz Alves

Santa Maria, RS, Brasil

2012

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**ATIVIDADE *in vitro* DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE CONDIMENTOS
FRENTE A *Candida glabrata* SENSÍVEIS E RESISTENTES AO
FLUCONAZOL**

elaborada por
Isaura Helena Soares

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

Comissão Examinadora:

Sydney Hartz Alves, Dr.
(Presidente/Orientador)

Cleci Menezes Moreira, Dr^a. (UNIPAMPA)

Leadir M. Fries, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, 17 de agosto de 2012.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por Sua presença constante em minha vida.

Aos meus pais, Sofia e José, sou grata pelo apoio, incentivo e segurança que me ofereceram durante esta etapa de minha vida.

Aos meus irmãos, Marcelo e Mauricio, e minha querida cunhada, Elenice, pelos momentos de alegria compartilhados.

Ao Péricles, pela cumplicidade, pelo conforto oferecido nos momentos difíceis, pela sua paciência, compreensão e ajuda prestada.

Ao Professor Sydney Hartz Alves, pela orientação, inspiração e ensinamentos que levaram ao amadurecimento dos meus conhecimentos e a execução desta dissertação.

Aos colegas do LAPEMI, pelo convívio e aprendizado.

À Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade de realizar esta pesquisa.

Enfim, a todos que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

ATIVIDADE *in vitro* DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE CONDIMENTOS FRENTE A *Candida glabrata* SENSÍVEIS E RESISTENTES AO FLUCONAZOL

Autora: Isaura Helena Soares

Orientador: Sydney Hartz Alves

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 17 de agosto de 2012.

No presente estudo, avaliou-se a atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais obtidos de *Origanum vulgare* (orégano), *Cinnamomum zeylanicum* (canela), *Lippia graveolens* (orégano mexicano), *Thymus vulgaris* (tomilho), *Salvia officinalis* (sálvia), *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Ocimum basilicum* (manjeriço) e *Zingiber officinale* (gengibre) frente aos isolados de *Candida glabrata*. Foi utilizado um grupo de 36 isolados de *C. glabrata* sensíveis ao fluconazol e outro grupo, derivado do primeiro, obtido após indução a resistência ao fluconazol *in vitro*, totalizando 72 isolados testados. Empregou-se a metodologia de microdiluição em caldo, utilizando-se concentrações de 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, 400 µg/mL, 800 µg/mL, 1600 µg/mL e 3200 µg/mL, através do qual se determinou Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM). Os óleos essenciais de tomilho, sálvia, alecrim, manjeriço e gengibre não evidenciaram atividade antifúngica nas concentrações testadas. Atividade antimicrobiana inferior ou igual à máxima testada (3200 µg/mL) foi observada para os óleos essenciais de orégano, orégano mexicano e canela. O óleo essencial de orégano apresentou a atividade antimicrobiana mais potente. Quando analisada a diferença entre os dois grupos de microrganismos, *C. glabrata* sensível ao fluconazol mostrou-se mais suscetível ao óleo essencial de orégano e orégano mexicano, e *C. glabrata* resistente ao fluconazol mostrou-se mais suscetível ao óleo essencial de canela.

Palavras-chave: *Candida glabrata*, óleos essenciais, atividade antifúngica.

ABSTRACT

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

In vitro* ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS EXTRACTED FROM CONDIMENTS AGAINST FLUCONAZOLE RESISTANT AND SENSIBLE *Candida glabrata

Autora: Isaura Helena Soares

Orientador: Sydney Hartz Alves

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 17 de agosto de 2012.

In the present study, *in vitro* antifungal activity of essential oils obtained from *Origanum vulgare* (oregano), *Cinnamomum zeylanicum* (cinnamon), *Lippia graveolens* (Mexican oregano), *Thymus vulgaris* (thyme), *Salvia officinalis* (sage), *Rosmarinus officinalis* (rosemary), *Ocimum basilicum* (basil) e *Zingiber officinale* (ginger) was assessed against *Candida glabrata* isolates. A group of 36 fluconazole-susceptible *C. glabrata* isolates were used and another group, derived from the first, obtained after *in vitro* induction of the fluconazole-resistance, totalizing 72 isolates tested. The methodology used was broth microdilution, concentrations of 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, 400 µg/mL, 800 µg/mL, 1600 µg/mL and 3200 µg/mL were used, through which Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Fungicidal Concentration (MFC) were determined. Thyme, sage, rosemary, basil and ginger essential oils showed no antifungal activity on the tested concentrations. Antimicrobial activity lower than or equal to 3200 µg/mL was observed for oregano, Mexican oregano and cinnamon essential oils, being oregano essential oil the most potent. Oregano essential oil has shown the best antifungal activity against fluconazole-susceptible *C. glabrata* group. Likely, Mexican oregano essential oil has shown the best antifungal activity against fluconazole-susceptible *C. glabrata* group. And cinnamon essential oil has shown the best antifungal activity against fluconazole-resistant isolates of *C. glabrata*.

Keywords: *Candida glabrata*, essential oil, antifungal activity.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Suscetibilidade de *C. glabrata* frente ao fluconazol antes (Cg FS) e após (Cg FR) a exposição ao fluconazol..... 32
- Tabela 2 - Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum*, *Lippia graveolens*, *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, *Thymus vulgaris* e *Zingiber sp.* frente a *C. glabrata* sensível e resistente ao fluconazol. 36
- Tabela 3 - Valores de P na comparação das CIMs e CFMs dos óleos essenciais de canela, orégano e orégano mexicano frente grupos de *C. glabrata*, sensíveis e resistentes ao fluconazol. 37
- Tabela 4 - Valores de P na comparação da atividade antifúngica, com base nas CIMs e CFMs, dos óleos essenciais frente isolados de *C. glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol utilizando valores de probabilidade obtidos pelo teste de Mann-Whitney..... 38

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1 Candidíases	11
2.2 Aspectos gerais de <i>Candida glabrata</i>	12
2.3 Óleos Essenciais	15
2.4 Condimentos e seus óleos essenciais.....	16
2.4.1 Óleo essencial de orégano (<i>Origanum vulgare</i>).....	16
2.4.2 Óleo essencial de gengibre (<i>Zingiber sp.</i>).....	17
2.4.3 Óleo essencial de tomilho (<i>Thymus vulgaris</i>).....	18
2.4.4 Óleo essencial de canela (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>).....	18
2.4.5 Óleo essencial de alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i>).....	19
2.4.6 Óleo essencial de sálvia (<i>Salvia officinalis</i>).....	19
2.4.7 Óleo essencial de manjeriço (<i>Ocimum basilicum</i>).....	20
2.4.8 Óleo essencial de orégano mexicano (<i>Lippia graveolens</i>).....	20
2.5 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais.....	21
2.6 Mecanismo de ação antimicrobiana dos óleos essenciais.....	24
3 OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo Geral	26
3.2 Objetivos Específicos.....	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1 Micro-organismos.....	27
4.2 Óleos essenciais	27
4.2.1 Obtenção dos óleos essenciais.....	28
4.3 Indução de resistência ao fluconazol <i>in vitro</i>.....	28
4.4 Avaliação da atividade dos óleos essenciais frente a <i>C. glabrata</i> sensíveis e resistentes ao fluconazol.....	29
4.4.1 Diluição dos óleos essenciais	29
4.4.2 Preparação do inóculo	29
4.4.3 Inoculação nas placas de microdiluição	30
4.4.4 Incubação e leitura das microplacas	30

4.4.5 Concentração fungicida mínima (CFM).....	31
4.4.6 CIM ₅₀ e CIM ₉₀	31
4.5 Análise estatística.....	31
5. RESULTADOS.....	32
5.1 Indução de resistência ao fluconazol <i>in vitro</i>.....	32
5.2 Perfil de suscetibilidade de <i>C. glabrata</i>, sensíveis e resistentes ao fluconazol, frente a óleos essenciais extraídos de condimentos.....	32
5.2.1 Suscetibilidade de <i>C. glabrata</i> frente ao óleo essencial de <i>Cinnamomum zeylanicum</i> ...	33
5.2.2 Suscetibilidade de <i>C. glabrata</i> frente ao óleo essencial de <i>Lippia graveolens</i>	33
5.2.3 Suscetibilidade de <i>C. glabrata</i> frente ao óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i>	34
5.3 Comparação das atividades dos óleos essenciais frente a <i>C. glabrata</i> sensíveis (Cg FS) e resistentes (Cg FR) ao fluconazol, com base nas CIMs e CFMs.....	37
6 DISCUSSÃO.....	39
6.1 Perfil de suscetibilidade de <i>C. glabrata</i>, sensíveis e resistentes ao fluconazol, frente aos óleos essenciais de <i>Ocimum basilicum</i> (manjeriço), <i>Rosmarinus officinalis</i> (alecrim), <i>Salvia officinalis</i> (salvia), <i>Thymus vulgaris</i> (tomilho) e <i>Zingiber sp.</i> (gingibre).....	41
6.2 Perfil de suscetibilidade de <i>C. glabrata</i> ao óleo essencial de <i>Cinnamomum zeylanicum</i> (canela).....	42
6.3 Perfil de suscetibilidade de <i>C. glabrata</i> ao óleo essencial de <i>Lippia graveolens</i> (orégano mexicano)	43
6.4 Perfil de suscetibilidade de <i>C. glabrata</i> ao óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> (orégano).....	44
6.5 Considerações finais	44
7 CONCLUSÕES.....	46
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

1 INTRODUÇÃO

As infecções por fungos do gênero *Candida* têm evidenciado aumentada prevalência nas últimas três décadas, tornando-se uma significativa causa de morbimortalidade, sobretudo entre pacientes com doenças hematológicas. Embora *Candida albicans* seja a espécie mais comumente encontrada, constatou-se também um significativo aumento na frequência de outras espécies, ditas não-*albicans* como: *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* (FIGUEROA *et al.*, 2009).

O espectro das candidíases é bastante extenso, indo desde manifestações banais, como a colonização de mucosas, até quadros sistêmicos, com invasão de vários órgãos. As mucosas mais frequentemente envolvidas, em quadros de candidíase, são as da boca, da vagina e do esôfago (SIDRIM & ROCHA, 2004).

Até recentemente, *C. glabrata* era considerada um fungo comensal relativamente não patogênico presente em mucosas do organismo humano. Devido a fatores como maior uso de agentes imunossupressores, prolongada hospitalização, antibioticoterapia e utilização do fluconazol, as candidíases por *C. glabrata* passaram a ser mais frequentemente diagnosticadas (FIDEL; VAZQUEZ; SOBEL, 1999). Atualmente *C. glabrata* emerge como a 2º espécie de *Candida* mais isolada de candidemias nos Estados Unidos e Europa; no Brasil é menos freqüente, ocupando a 5º posição entre os agentes causadores de candidemias em paciente humanos. Por outro lado, considerando-se que as taxas de candidemias no Brasil são, aproximadamente 4 vezes mais elevadas do que na Europa e Estados Unidos, a presença de *C. glabrata* em hospitais brasileiros é tão alta quanto naqueles países. O maior problema relacionado às infecções por *C. glabrata* é sua resistência a antifúngicos azólicos, os quais costumam ser efetivos no tratamento de infecções causadas por outras espécies de *Candida* (MACÊDO *et al.*, 2008).

Antifúngicos azólicos, como o fluconazol, têm sido amplamente usados desde 1990 para profilaxia e tratamento de infecções causadas por *Candida*; há sugestões de que esta prática tenha determinado um aumento no número de infecções causadas por espécies menos suscetíveis ou resistentes, como *C. glabrata* e *C. krusei* (BORST *et al.*, 2005).

Se por um lado a alta tecnologia das indústrias farmacêuticas tem resultado em antimicrobianos cada vez mais potentes, por outro lado, a resistência aos antifúngicos é um problema crescente cuja detecção não está completamente solucionada. Alguns vegetais

utilizados com fins terapêuticos têm acompanhado a história da humanidade; todavia diante dos preocupantes quadros de resistência aos antimicrobianos conhecidos, é cada vez mais requerido o reconhecimento de novas possibilidades terapêuticas, onde o uso de vegetais como opção terapêutica tem se destacado. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, os vegetais poderão constituir-se na melhor fonte para obtenção de novos candidatos a fármacos voltados a quase todas as patologias humanas (NOGUEIRA; DINIZ; LIMA, 2008).

As plantas possuem vias metabólicas primárias e secundárias que dão origem a compostos farmacologicamente ativos como alcalóides, flavonóides, isoflavonóides, taninos, cumarinas, glicosídeos, terpenos, poliacetilenos, que são específicos a determinadas famílias, gêneros ou espécies e que têm funções químico-farmacológicas diversas (NOGUEIRA; DINIZ; LIMA, 2008).

Os óleos essenciais ou essências, têm se destacado como uma classe de produtos de origem vegetal com ampla utilização, e a atividade antimicrobiana vem sendo estudada com algum sucesso. Os óleos essenciais merecem especial atenção porque os condimentos são vegetais utilizados há milhares de anos pelo homem, manifestando baixa ou ausência de toxicidade; estas características os tornam alvo de investigações quanto a suas potencialidades antimicrobianas, incluindo a atividade antifúngica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Candidíases

Candidíases são infecções fúngicas causadas por leveduras do gênero *Candida*. Essas leveduras são responsáveis pela colonização e infecção superficial de regiões como unhas, pele, mucosa oral, vagina e mucosa ocular, e manifestam-se também como infecções sistêmicas em indivíduos imunocomprometidos (CROCCO *et al.*, 2004). Candidíase é a infecção fúngica de mucosas mais frequente entre pacientes com AIDS, destacando-se a candidíase de orofaringe que irá acometer até 90% desses indivíduos em algum estágio de sua doença. Estudos epidemiológicos identificam uso de cateteres intravasculares, exposição prévia a antibióticos, colonização da mucosa e neutropenia como fatores de risco para desenvolvimento de infecções invasivas por *Candida*, as quais estão associadas a considerável morbidade e mortalidade (PFALLER, 1996; NETO *et al.*, 1997; ALLY *et al.*, 2001).

Leveduras do gênero *Candida* estão presentes na microbiota da pele e mucosa do homem desde o nascimento. São isoladas da microbiota da cavidade bucal com frequência que varia entre 30% e 60% (MARTINS *et al.*, 2002; RIBEIRO *et al.*, 2004). Entre mulheres adultas saudáveis, 20% a 25% apresentam colonização assintomática da vulva e vagina, sendo que 75% delas, em algum momento, apresentam algum episódio de infecção clínica em suas vidas (HOLANDA *et al.*, 2007). A infecção por *Candida* se instala quando há uma ruptura do equilíbrio biológico, devido fatores patológicos, fisiológicos, imunológicos e mecânicos, resultando em aumento na multiplicação e/ou invasão destes micro-organismos em tecidos (MARTINS *et al.*, 2002).

A identificação da espécie de *Candida* que provoca a infecção fúngica é essencial, pois diferentes espécies apresentam diferentes fatores de virulência e distintos perfis de sensibilidade aos antimicóticos. Apesar de *Candida albicans* ser a espécie mais comumente isolada nas infecções superficiais e invasivas, é crescente a incidência de infecções provocadas por espécies não-albicans, como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei*. As técnicas para identificação da espécie de *Candida* incluem métodos bioquímicos, testes cromogênicos, e técnicas moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR)

(CROCCO *et al.*, 2004; MÍMICA *et al.*, 2009; CANDIDO *et al.*, 2000; ARAUJO *et al.*, 2005).

Candidemia está entre as mais importantes infecções fúngicas nosocomiais, correspondendo a cerca de 80% das infecções fúngicas de origem hospitalar (TAMARU *et al.*, 2007). Associada à elevada morbidade, maior tempo de hospitalização, alta mortalidade e alto custo de tratamento, essa infecção é particularmente observada em pacientes submetidos a terapias antimicrobianas por longos períodos, terapias imunossupressoras agressivas, nutrição parenteral e procedimentos invasivos (ZAOUTIS *et al.*, 2005). *Candida albicans* é a espécie predominantemente isolada em candidemias; nas últimas décadas mais frequentemente são isoladas *C. albicans* com suscetibilidade reduzida a azólicos ou até mesmo espécies não-*albicans* intrinsecamente resistentes a estes antifúngicos, como *C. glabrata* e *C. krusei* (PFALLER, 1996; MARCHETTI *et al.*, 2004).

Em pacientes portadores de infecções nosocomiais por leveduras, especialmente *Candida*, a resistência a drogas antifúngicas constitui-se num sério problema terapêutico. Entre os vários agentes antifúngicos disponíveis para tratamento de infecções por *Candida*, o fluconazol permanece como o preferido para tratar candidíases disseminadas em pacientes não neutropênicos, hemodinamicamente estáveis e sem suspeita de estarem infectados com espécies resistentes a antifúngicos azólicos. Este azólico apresenta um conjunto de características que inclui eficácia, perfil de toxicidade, facilidade de administração e custo de tratamento, que o torna vantajoso quando comparado a anfotericina B, itraconazol, caspofungina e voriconazol (SPELLBERG *et al.*, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2004; ALLY *et al.*, 2001; PAPPAS *et al.*, 2007). A resistência ao fluconazol já está claramente documentada entre *Candida* spp isoladas de pacientes com HIV que apresentam candidíase recorrente de orofaringe (SANGEORZAN *et al.*, 1994). Por outro lado, o uso inadequado de fluconazol pode ser o fator que tenha levado a maior frequência de isolados de *C. glabrata* como agente etiológico de candidemias e possivelmente ao aumento da resistência secundária a este e outros azólicos (PFALLER & DIEKEMA, 2004).

2.2 Aspectos gerais de *Candida glabrata*

Candida glabrata é um fungo leveduriforme monomórfico, haplóide, historicamente considerado não patogênico e saprófita da microbiota normal de indivíduos saudáveis

(BRIALAND *et al.*, 2001). Com a emergência das infecções sistêmicas causadas por fungos leveduriformes do gênero *Candida* houve também um aumento acentuado na proporção de infecções causadas por espécies não-*albicans*, incluindo-se *C. glabrata* (LIN *et al.*, 2005).

As infecções por *C. glabrata* podem ser superficiais, cutâneo-mucosas ou sistêmicas, sendo mais comum, enquanto agente oportunista, entre pacientes imunocomprometidos. Dependendo do sítio de infecção, *C. glabrata* é frequentemente a segunda ou terceira mais comum causa de candidíase, ficando atrás apenas de *C. albicans* (FIDEL; VAZQUEZ; SOBEL, 1999).

C. glabrata é especialmente importante não somente porque houve um recente aumento na sua frequência, mas devido a sua menor suscetibilidade inata a agentes antifúngicos, especialmente aos azólicos (VAZQUEZ *et al.*, 1998). Mais de 10% dos isolados de infecção sistêmica podem ser altamente resistentes a fluconazol, com Concentração Inibitória Mínima (CIM) superior a 64 µg/mL (PFALLER *et al.*, 2009).

Pacientes com colonização ou infecções por *C. glabrata* requerem período de hospitalização mais longo e, os custos hospitalares tornam-se significativamente aumentados (VAZQUEZ *et al.*, 1998). A ausência de alguns fatores de virulência em *C. glabrata*, como pseudohifas (que aumentam a aderência fúngica e a capacidade de penetrar no tecido), sugerem menor virulência desta espécie quando comparada a outras espécies de *Candida*; entretanto, o que se evidencia em pacientes imunocomprometidos é uma expansão rápida da infecção acompanhada de elevadas taxas de mortalidade (FIGUEROA *et al.*, 2009).

Alguns estudos apontam a produção de proteinases (CORRÊA *et al.*, 2009), a hidrofobicidade da superfície celular (FIGUEROA *et al.*, 2009) e a capacidade de produzir biofilme (TAMURA *et al.*, 2007) como fatores de virulência da *C. glabrata*; entretanto, a resistência secundária parece estar mais envolvida entre isolados de candidemias (FIGUEROA *et al.*, 2009).

A resistência secundária ou adquirida é descrita quando um isolado, previamente sensível a um fármaco, passa a exibir resistência ao antimicótico utilizado (FIDEL; VAZQUEZ; SOBEL, 1999). O principal mecanismo de *C. glabrata* envolvido no rápido desenvolvimento de resistência secundária ao fluconazol é a superexpressão de genes que codificam os transportadores ABC (ATP binding cassette) de membrana, como o gene CgCDR1 e CgPDR1, determinando acentuado efluxo de antifúngico e, conseqüentemente, redução da concentração intra-celular do fármaco (SANGLARD *et al.*, 1999; GYGAX *et al.*, 2008). A rápida aquisição de resistência a azólicos por células fúngicas chamadas “petite mutants” é atribuída a superexpressão do gene CgPDR1. Essas células apresentam perda ou

deleção de genoma mitocondrial, fenotipicamente não crescem em meios a base de açúcar não fermentável e crescem de forma deficiente em meios suplementados com glicose, além disso, demonstraram ser mais virulentos em experimentos com modelos animais (TSAI *et al.*, 2006; FERRARI *et al.*, 2011).

Devido a possibilidade de ocorrência das duas formas de resistência, primária ou adquirida ao fluconazol, a rápida identificação de *C. glabrata* é essencial como guia à antifungoterapia. Apesar das características morfológicas da colônia em cultura e do exame microscópico auxiliar na identificação da *C. glabrata*, a identificação definitiva requer testes adicionais (LOPEZ *et al.*, 2001).

Entre as espécies de leveduras isoladas em laboratório de micologia médica, *C. glabrata* é a única espécie caracterizada por assimilar trealose e não assimilar sacarose (LOPEZ *et al.*, 2001); este padrão de assimilação de carboidratos pode ser utilizado em testes bioquímicos para diferenciação com outras espécies de *Candida*. As técnicas de biologia molecular também têm sido empregadas na identificação e podem detectar variações sutis entre cepas fenotipicamente similares (VAZQUEZ *et al.*, 1998).

Nas candidemias, as maiores taxas de mortalidade envolvem *C. glabrata*. Malani *et al.* (2005) descreveram taxas de mortalidade de até 29% associadas a fungemias causadas por *C. glabrata*. Em outro estudo, as candidemias em pacientes não neutropênicos foram associadas a taxas de mortalidades de 36,4% quando causada por *C. glabrata* contra 16,3% quando causadas por *C. albicans*. Dados clínicos apontam que, possivelmente, sub-doses de fluconazol, tenham sido responsáveis pelo aumento de risco a mortalidade (PAI *et al.*, 2007).

Em um estudo de suscetibilidade publicado por Pfaller *et al.* (2009), incluindo 642 isolados sanguíneos de *C. glabrata*, 10% a 17% manifestaram resistência ao fluconazol. O voriconazol, embora em menor grau, claramente demonstrou resistência cruzada com o fluconazol. Por outro lado, as equinocandinas evidenciaram excelente atividade contra os isolados fluconazol-resistentes (99% a 100% dos isolados foram sensíveis a anidulafungina, caspofungina e micafungina). Já em um estudo brasileiro, todos os isolados de *C. glabrata* se mostraram sensíveis a flucitosina, anfotericina B e voriconazol (FRANÇA; RIBEIRO; TELLES, 2008).

C. glabrata tem sido frequentemente relacionada à candidíase vulvovaginal ou a candidemias ou micose sistêmica severa em pacientes criticamente imunocomprometidos (FIGUEROA *et al.*, 2009). As equinocandinas, voriconazol, flucitosina e anfotericina B também se constituem em opções ao tratamento das infecções causadas por *C. glabrata*,

requerendo-se, entretanto, observar suas específicas indicações (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006).

2.3 Óleos Essenciais

A ISO (International Standard Organization) define óleos essenciais como os produtos obtidos de partes de plantas, através de destilação por arraste com vapor d'água, bem como os produtos obtidos por espremedura dos pericarpos de frutos cítricos (família *Rutaceae*). De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas (SIMÕES *et al.*, 1999).

Entre os constituintes dos óleos essenciais, podem ser encontrados hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, entre outros. Na mistura, tais compostos, apresentam-se em diferentes concentrações; normalmente, um deles é o majoritário, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades, sendo denominados de elementos traços. Neste contexto, a grande maioria dos óleos essenciais é constituída de derivados fenilpropanóides ou de terpenóides, sendo estes preponderantes. Os compostos terpênicos mais freqüentes nos óleos voláteis são os monoterpenos (em cerca de 90%) e os sesquiterpenos; todavia, podem estar presentes os diterpenos em óleos essenciais extraídos com solventes orgânicos (SIMÕES *et al.*, 1999). Os terpenos estão entre os principais responsáveis químicos pelo uso das plantas odoríferas na medicina, culinária e perfumaria (DORMAN & DEANS, 2000).

A concentração de fitoconstituintes nos óleos essenciais e extratos de plantas pode variar dependendo de fatores, que vão desde o cultivo da planta, os vários quimiotipos (vegetais idênticos botanicamente, mas que diferem quanto a algumas características químicas), a sua colheita, até a forma de obtenção de extrato ou óleo essencial (NOGUEIRA; DINIZ; LIMA, 2008; SIMÕES *et al.*, 1999). Alguns estudos reportam que o óleo essencial total tem uma atividade antimicrobiana mais importante que a maioria dos componentes que o constitui. Isto sugere que componentes em menor quantidade poderiam igualmente ter influencia sobre suas propriedades antimicrobianas (KIRCHNER *et al.*, 2010).

Os óleos essenciais têm muitas aplicações na indústria de alimentos, cosméticos e na indústria farmacêutica. Sua atividade antimicrobiana tem sido reconhecida em vários estudos (VICTÓRIO *et al.*, 2009; HAMMER *et al.*, 1999). Os óleos essenciais das espécies de

condimentos contêm diferentes compostos que contribuem com as propriedades antimicrobianas, como aldeído cinâmico e eugenol presentes no óleo essencial de canela, o timol presente nos óleos de orégano e tomilho, e α -zingibereno presente no óleo de gengibre (KOROCH *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2004).

2.4 Condimentos e seus óleos essenciais

Condimentos ou temperos são produtos constituídos de uma ou diversas substâncias sápidas, de origem natural, com ou sem valor nutritivo, empregados nos alimentos com o objetivo de modificar ou exaltar o seu sabor (Resolução CNNPA nº12 de 1978). Segundo Hoffmann *et al.* (1999) os temperos ou condimentos, assim como as especiarias, são substâncias de origem vegetal geralmente usadas para conferir sabor agradável aos alimentos. Eles possuem propriedades antimicrobianas, antioxidantes e medicinais. As propriedades antimicrobianas dos condimentos e de seus óleos essenciais têm sido estudadas principalmente com relação ao efeito inibidor de micro-organismos patogênicos presentes em alimentos (SOUZA *et al.*, 2004).

2.4.1 Óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*)

O orégano é um condimento que apresenta propriedade digestiva, espasmolítica, carminativa, expectorante, anti-séptica, emenagoga, analgésica, anti-reumática, cicatrizante e antiparasitária. Seu óleo essencial é rico em carvacrol, timol e terpineol (LEITE *et al.*, 2009).

Ao longo da história o óleo essencial de orégano tem sido usado tanto como flavorizantes como preservativo, e numerosos estudos *in vitro* e em alimentos descrevem sua atividade antibacteriana e antifúngica contra micro-organismos como *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas sóbria*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus* (HAMMER *et al.*, 1999; LAMBERTE *et al.*, 2001; COSTA *et al.*, 2009).

No Brasil, Costa *et al.* (2009) descreveram a atividade antibacteriana “*in vitro*” do óleo essencial de *Origanum vulgare* sobre bactérias multirresistentes isoladas de materiais biológicos, demonstrando que em baixas concentrações, este óleo é capaz de inibir o crescimento e causar a morte de *Acinetobacter baumannii*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* e *S. aureus* resistente a metilina (MRSA). Os autores concluíram com base nos dados obtidos, que não houve diferença na concentração bactericida mínima (0,5%) do referido óleo tanto para os micro-organismos Gram positivos quanto para os Gram negativos.

2.4.2 Óleo essencial de gengibre (*Zingiber* sp.)

O uso do gengibre é bem conhecido na culinária como tempero. Na medicina popular é utilizado no tratamento de disenterias, malária, reumatismo e resfriado. Seu óleo essencial é composto por uma diversidade de terpenos, entre eles zingibereno e bisaboleno que são responsáveis pelo sabor forte e picante do gengibre (ZAGO *et al.*, 2009).

Os gingeróis, principalmente o 6-gingerol, são identificados como os maiores constituintes dos rizomas de gengibre fresco e têm sido atribuídos a eles vários efeitos farmacológicos: analgésico, antipirético, atividade anti-hepatotóxica, antinauseante e anti-inflamatória (GRÉGIO *et al.*, 2006).

Através de análises em CG/EM (cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa) e CG-DIC (cromatografia em fase gasosa equipado com detector por ionização de chamas), Andrade *et al.* (2012) identificaram e quantificaram os constituintes do óleo essencial de *Zingiber officinale*, encontrando como compostos majoritários os monoterpenos oxigenados, geranial (25,06%), neral (16,47%), 1,8-cineol (10,98%), geraniol (8,51%) e acetato de geranila (4,19%) e o monoterpeno bicíclico canfeno (4,30%). Em teores minoritários foram identificados α -zingibereno, (E,E)- α -farneseno, ar-curcumeno, β -bisaboleno, β -sesquifelandreno.

2.4.3 Óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*)

O óleo essencial de tomilho é amplamente empregado por suas ações anti-séptica, expectorante, antiespasmódica, carminativa e flavorizante. Suas propriedades estão relacionadas com o elevado teor de timol e seu isômero de posição carvacrol, que perfazem 40% a 50% do óleo. Estes componentes apresentam atividades antibacteriana e antifúngica superiores ao fenol e, ao mesmo tempo, menor toxicidade do que este (SIMÕES *et al.*, 1999).

Em uma pesquisa realizada por Imelouane *et al.* (2009), que avaliaram a composição química do óleo essencial de tomilho, não foi encontrada a substância carvacrol entre seus componentes, porém foram identificados cânfora, canfeno, α -pineno, 1,8-cineol, borneol e β -pineno. Timol estava presente como componente minoritário. Neste estudo o óleo essencial de tomilho apresentou destacada atividade frente a bactérias Gram-negativas.

Os óleos essenciais de *Zingiber officinalis* e *Thymus vulgaris* apresentaram atividade contra cepas de Vírus Herpes Simplex tipo 1 (VHS-1) sensíveis e resistentes ao aciclovir, possivelmente devido a interferência na estrutura do envelope viral (SCHNITZLER; KOCH; REICHLING, 2007). O óleo essencial de tomilho mostrou-se eficaz também na inibição *in vitro* do desenvolvimento micelial dos fungos *Rhizopus* sp., *Penicillium* spp., *Eurotium repens* e *Aspergillus niger* (SOUZA *et al.*, 2004).

2.4.4 Óleo essencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*)

O óleo essencial de canela, bem como a canela em pó, é empregado na preparação de alguns medicamentos na área farmacêutica. Esta planta apresenta propriedade estomáquica, carminativa e emenagoga. Os principais componentes encontrados em seu óleo essencial são cinamaldeído e eugenol (GENDE *et al.*, 2008).

Em um trabalho realizado por Andrade *et al.* (2012), dos três óleos essenciais estudados o óleo essencial de canela foi o mais efetivo na inibição do crescimento bacteriano. Esse resultado pode estar relacionado com a presença do componente majoritário aldeído cinâmico em elevada concentração (77,72%), quando comparada com os óleos essenciais de citronela e gengibre, que foram as outras plantas estudadas. De acordo com Burt (2004), o mecanismo de ação do aldeído cinâmico seria semelhante a outros aldeídos, que é

normalmente considerado como aquele que provoca danos a lipídios e proteínas. Além das perturbações descritas para monoterpenóides, acredita-se que o grupo carbonila é capaz de se ligar às proteínas, impedindo a ação das enzimas aminoácido decarboxilases em *Enterobacter aerogenes*.

2.4.5 Óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*)

O alecrim é utilizado popularmente no tratamento de amigdalites, anemias, bronquite, cefaléia, cólica, indigestão, náusea, entre outros. Seu óleo essencial é constituído por hidrocarbonetos monoterpênicos, ésteres terpênicos, linalol, verbinol, terpineol, 3-octanona e acetato de isobornila. Os terpenóides são representados pelo carnosol, ácidos carnosílico, oleânico, ursólico, entre outros. Os flavonóides incluem diosmetina, diosmina, gencuanina, luteolina, hispidulina e apigenina. Apresenta ainda os ácidos rosmarínico, caféico, clorogênico, neoclorogênico e labiático (SILVA *et al.*, 2008).

Lima *et al.* (2006), através de um método de difusão em meio sólido, realizaram ensaios de avaliação da atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*; seis óleos essenciais foram testados, entre eles os óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum* e *Rosmarinus officinalis*. O óleo essencial de canela inibiu o crescimento da maioria das cepas ensaiadas (58%); já o óleo essencial de alecrim mostrou uma efetividade antifúngica inferior com a inibição de apenas quatro das doze cepas testadas. Em um estudo realizado por Correa-Royero *et al.* (2010), a concentração de 500 µg/mL do óleo essencial de alecrim inibiu o crescimento *in vitro* de *Candida krusei*.

2.4.6 Óleo essencial de sálvia (*Salvia officinalis*)

A sálvia é empregada na forma de infusão para tratar afecções gastrointestinais, respiratórias, renais, hepáticas e nervosas. A esta planta atribui-se propriedades antioxidante, anti-séptica, adstringente, carminativa, cicatrizante, desinfetante, entre outras. Seu óleo essencial é rico em terpenóides como tujona, cineol, cânfora, borneol, ácido ursólico (LORENZI & MATOS, 2002).

O efeito antibacteriano do óleo essencial de *Salvia officinalis* foi verificado em um estudo *in vitro* envolvendo *Escherichia coli*, *Salmonella thyphymurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Yersinia enterocolitica*, sendo esse efeito mais pronunciado sobre isolados de *L. monocytogenes* (BARRA & VANETTI, 1998).

Pereira *et al.* (2004) verificaram a atividade antibacteriana de óleos essenciais de *Ocimum gratissimum*, *Cytopogum citratus* e *Salvia officinalis* frente a patógenos isolados do trato urinário. *Salvia officinalis* apresentou ação inibitória superior às outras ervas, tendo eficácia de 100% quando testadas em espécies de *Klebsiella* e *Enterobacter*, 96% em *Escherichia coli*, 83% contra *Proteus mirabilis* e 75% contra *Morganella morganii*.

2.4.7 Óleo essencial de manjeriço (*Ocimum basilicum*)

O manjeriço é uma erva odorífera tradicionalmente empregada na culinária e na medicina popular. Possui ação antiespasmódica, antitérmica e digestiva, além de ser efetivo contra algumas infecções bacterianas e parasitárias. Seu óleo essencial é composto geralmente por timol, metil-chavicol, linalol, eugenol e cineol (LORENZI & MATOS, 2002).

O óleo essencial de *Ocimum basilicum*, na concentração de 500 partes por milhão (ppm), inibiu completamente *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus* e *Fusarium moniliforme* (SOLIMAN & BADEAA, 2002). Muitos cientistas tem relacionado a alta concentração de linalol com a atividade antimicrobiana do manjeriço (HANIF *et al.*, 2011).

2.4.8 Óleo essencial de orégano mexicano (*Lippia graveolens*)

Lippia graveolens, popularmente denominada orégano mexicano, é um vegetal utilizado como condimento, e está documentado unicamente na Farmacopéia Mexicana. Seu óleo essencial é caracterizado pelo alto conteúdo de monoterpenos como carvacrol, timol e *p*-cimeno. A composição química do óleo essencial de *Lippia graveolens* é similar à composição química do óleo essencial de *Origanum vulgare*, porém os componentes estão presentes em diferentes concentrações. O orégano mexicano é caracterizado por alto conteúdo de timol e menor conteúdo de carvacrol, já *O. vulgare* apresenta como componente

majoritário o carvacrol, aparecendo timol em concentrações mais baixas (SALGUEIRO *et al.*, 2003; WONG *et al.*, 2010).

O óleo essencial de *Lippia graveolens* demonstrou atividade antifúngica contra isolados de *Candida albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei* em um estudo *in vitro* conduzido por Pozzatti *et al.* (2008).

A propriedade antifúngica do óleo essencial de orégano mexicano também foi avaliada frente a *Fusarium oxysporum*. Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 0,20 µg/mL e 0,25 µg/mL do óleo essencial foram capazes de inibir completamente o crescimento micelial do fungo, e a concentração de 0,5% do óleo essencial foi capaz de inibir completamente a colonização de sementes de tomate por *F. oxysporum*. Estes resultados mostram o potencial fungistático e fungicida do óleo essencial de orégano mexicano (WONG *et al.*, 2010).

2.5 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais

Andrade *et al.* (2012) determinaram as características químicas e a atividade antibacteriana *in vitro* dos óleos essenciais de *Cymbopogon nardus* (citronela), *Cinnamomum zeylanicum* (canela) e *Zingiber officinale* (gengibre) frente a *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella cholerasuis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Quanto à composição química os constituintes majoritários encontrados no óleo essencial de *C. nardus* foram citronelal (47,12%), geraniol (18,56%) e citronelol (11,07%), no óleo essencial de *C. zeylanicum* foram identificados (E)-cinamaldeído (77,72%), acetato de (E)-cinamila (5,99%) e o monoterpênóide 1,8-cineol (4,66%) e, para *Z. officinale* os compostos majoritários foram geranial (25,06%), neral (16,47%), 1,8-cineol (10,98%), geraniol (8,51%), acetato de geranila (4,19%) e o canfeno (4,30%). Os óleos essenciais apresentaram atividade antibacteriana tanto para bactérias Gram-negativas como para bactérias Gram-positivas, sendo que o óleo essencial de *C. zeylanicum* foi o mais eficiente, pois foi o único que apresentou efeito inibitório contra *E. coli*, resultado relacionado a elevada concentração de aldeído cinâmico encontrado neste óleo essencial (77,72%). Sabe-se que, na maioria das vezes, bactérias Gram-negativas são menos sensíveis aos óleos essenciais que bactérias Gram-positivas, pois a parede celular das Gram-negativas é rica em polissacarídeos o que inibe a penetração das substâncias antimicrobianas. O aldeído cinâmico, semelhante a outros

aldeídos, provoca dano a lipídios e proteínas, e é capaz de se ligar às proteínas, impedindo a ação das aminoácido-descarboxilases presentes em *Enterobacter aerogenes* (BURT, 2004).

Cleff *et al.* (2010) realizaram um estudo para avaliar a atividade *in vitro* do óleo essencial extraído de *Origanum vulgare* frente a *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* e *C. dubliniensis*. Todos os isolados foram sensíveis ao óleo essencial de *O. vulgare*. *C. albicans* apresentou valores de CIM de 2,72 µL/mL e CFM de 5 µL/mL, a CIM e CFM para espécies não-*albicans* foi de 2,10 µL/mL e 2,97 µL/mL, respectivamente. Os constituintes majoritários identificados neste óleo foram: 4-terpineol (47,95%), carvacrol (9,42%), timol (8,42%) e α -terpineol (7,57%). A concentração de monoterpenos fenólicos foi considerada alta e os autores atribuíram a atividade antifúngica deste óleo essencial à presença de timol, carvacrol e eugenol.

Lambert *et al.* (2001) realizaram um estudo para avaliar a atividade do óleo essencial de orégano e de seus constituintes timol e carvacrol contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Foram testadas as substâncias timol e carvacrol isoladamente assim como sua mistura. Após as análises, concluiu-se que a mistura de carvacrol com timol apresentou efeito aditivo e é mais efetiva do que o óleo essencial de orégano. Em conclusão, observou-se que a atividade antimicrobiana do óleo essencial de orégano pode ser atribuída à presença destes dois compostos.

O óleo essencial de *Ocimum basilicum* foi analisado por CG-MS e testado quanto as suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas. Os principais componentes químicos encontrados neste óleo essencial foram: linalol (69,9%), geraniol (10,9%), 1,8-cineol (6,4%), α -bergamoteno (1,6%) e acetato de geraniol (1,4%). O óleo essencial de manjeriço exibiu acentuada atividade antimicrobiana contra *Streptococcus pneumoniae* (1), *Haemophilus influenzae*, *Candida albicans*, *S. pneumoniae* (2) e *Aspergillus niger*. No entanto, *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas aeruginosa* mostraram-se altamente resistentes ao óleo essencial do manjeriço (HANIF *et al.*, 2011).

Mangena & Muyima (1999) através da técnica de difusão em ágar avaliaram a ação antimicrobiana de três óleos essenciais, entre eles o óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*). O óleo essencial de alecrim apresentou ação antibacteriana contra *Acinetobacter lwoffii*, *Shigella flexneri*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterobacter aerogenes*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus subtilis*, *Erwinia carotovora*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella enteritidis* e *Salmonella typhi*. Em geral, as bactérias Gram-positivas apresentaram-se mais sensíveis ao óleo essencial de alecrim do que as Gram-negativas, sendo que *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas fluorescens* não

demonstraram sensibilidade ao mesmo. Sua atividade também foi observada frente a *Saccharomyces cerevisiae* e outras leveduras. A composição química do óleo de alecrim caracterizou-se principalmente por: 1,8-cineol (31,12%), cânfora (30,12%), α -pineno (18,18%) e canfeno (6,08%).

Gachkar *et al.* (2007) caracterizaram química e biologicamente dois óleos essenciais, entre eles o óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*). Através de ensaios *in vitro* o óleo essencial de alecrim exibiu atividade bactericida contra *E. coli*, *S. aureus* e *L. monocytogenes* após 25, 240 e 120 minutos de exposição, respectivamente. Neste estudo os componentes majoritários encontrados no óleo essencial de alecrim foram piperitone (23,7%), α -pineno (14,9%), linalol (14,9%), 1,8-cineol (7,43%) e cânfora (4,97%). Diferentes composições do óleo essencial de alecrim já foram descritas; entretanto, é conhecido que variantes da mesma espécie podem diferir quanto à constituição dos seus óleos essenciais e que diferenças na composição química do óleo essencial também pode ser atribuída a fatores como forma de cultivo e clima.

Imelouane *et al.* (2009) avaliaram a composição química e a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Thymus vulgaris*. Cânfora (38.54%), canfeno (17.19%), α -pineno (9.35%), 1,8-cineol (5.44%), borneol (4.91%) e β -pineno (3.90%) foram os componentes majoritários encontrados neste óleo essencial. Contrariamente aos resultados da maioria dos estudos, a maior atividade antibacteriana foi observada frente a bactérias Gram-negativas *Pantoea* sp (CIM igual a 0,66 mg/mL) e *Escherichia coli* (CIM = 0,33 mg/mL) quando comparada a atividade frente o crescimento de bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* (CIM = 1,33 mg/mL), *Staphylococcus epidermidis* (CIM = 1,33 mg/mL) e *Streptococcus* sp (CIM= 2,67 mg/mL). Bactérias Gram-negativas são mais resistentes aos óleos essenciais de plantas uma vez que lipopolissacarídeos da parede celular evitariam o acúmulo de óleo essencial na membrana celular destas bactérias, mas o autor justifica que a atividade antimicrobiana do óleo essencial depende de sua composição química, que é determinada pelo genótipo e influenciada por condições ambientais e agrônômicas.

Proeminente atividade antifúngica do óleo essencial de orégano mexicano (*Lippia graveolens*) frente a espécies de *Candida* spp sensíveis e resistentes ao fluconazol foi descrita por Pozzatti *et al.* (2008). Com exceção de isolados de *Candida tropicalis*, sensíveis ao fluconazol, que foram inibidos por concentrações de 1600 μ g/mL do óleo essencial, todos os demais isolados (*C. albicans* sensível e resistente ao fluconazol, *C. dubliniensis* sensível e resistente ao fluconazol, *C. tropicalis* resistente ao fluconazol, *C. glabrata* e *C. krusei*) apresentaram CIM igual ou inferior a 800 μ g/mL. Os componentes majoritários identificados

no óleo essencial de orégano mexicano utilizado nesse estudo foram o carvacrol (56,8%) e o cimeno (32,2%). A concentração de γ -terpineno, timol e α -tujeno foram, respectivamente 3,67%, 2,17% e 1,10%.

Em outro estudo, o óleo essencial de orégano mexicano e um de seus componentes majoritários, o carvacrol, foram testados quanto a atividade antiviral frente a vírus que causam doenças em humanos e animais. O óleo essencial de orégano mexicano mostrou-se eficaz em inibir cinco dos oito vírus examinados, e o carvacrol cinco de seis vírus testados. Apenas o carvacrol apresentou atividade antiviral frente ao Rotavírus humano, mas este composto se mostrou menos eficiente que o óleo essencial em inibir os outros vírus. Assim o óleo essencial de orégano mexicano mostrou-se mais efetivo que a substância isolada, o que pode ser atribuído a um possível efeito sinérgico entre os componentes do óleo essencial (PILAU *et al.*, 2011).

Óleos essenciais de condimentos foram testados quanto sua atividade antibacteriana através de técnica de microdiluição em caldo. Óleos essenciais de orégano, tomilho e orégano mexicano, assim como os constituintes majoritários carvacrol, timol e cinamaldeído evidenciaram atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus* spp. Amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves e bovinos evidenciaram suscetibilidade frente a óleos essenciais de orégano, tomilho, canela e orégano mexicano. Mesmo os isolados com variado perfil de resistência a antimicrobianos demonstraram suscetibilidade aos óleos essenciais de condimentos e seus constituintes majoritários, fato que foi considerado como indicador da boa atividade destes produtos (DAL POZZO *et al.*, 2011; SANTURIO *et al.*, 2011).

2.6 Mecanismo de ação antimicrobiana dos óleos essenciais

A inibição de micro-organismo por óleos essenciais parece envolver diversos mecanismos de ação. Sugere-se que a maioria dos óleos essenciais exerça sua atividade antimicrobiana através de modificações na estrutura da parede celular do micro-organismo. O acúmulo de constituintes hidrofóbicos dos óleos essenciais na bicamada lipídica da membrana citoplasmática irá conferir a esta uma característica de permeabilidade, promovendo a dissipação da força próton motiva, redução do pool de ATP, do pH interno e do potencial elétrico, e a perda de íons como potássio e fosfato. Esses danos na membrana levam ao comprometimento das suas funções, ocorre perda do controle quimiosmótico da célula e a

consequente morte do micro-organismo (ANDRADE *et al.*, 2012). Em estudo realizado por Lambert *et al.* (2001), demonstrou-se que, em geral, os monoterpênicos agem na membrana celular, fato este comprovado pela observação de que o óleo essencial de orégano, assim como seus constituintes, timol e carvacrol, acumularam-se na membrana celular de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* resultando no aumento da permeabilidade em 90% das células destes micro-organismos.

A ação antimicrobiana dos óleos essenciais pode ser também devido à inativação de algumas enzimas, incluindo as envolvidas na produção de energia e síntese dos componentes estruturais, assim contribuindo para destruição ou inativação do material genético. Compostos fenólicos presentes em óleos essenciais podem causar distúrbios nas proteínas da membrana e inibir a respiração celular. Além do mais, alterações no processo de transporte da membrana e modificações na atividade dos canais de cálcio podem causar aumento da permeabilidade celular e consequente depleção de constituintes intracelulares vitais (CLEFF *et al.*, 2010).

Com relação aos álcoois terpênicos, como citronelol, geraniol, α -terpineol e linalol, encontrados no gengibre, sugere-se que agem como desidratantes e solventes provocando a desnaturação das proteínas. Já o mecanismo de ação de aldeídos, como o aldeído cinâmico encontrado no óleo essencial de canela, é normalmente considerado como aquele que provoca danos a lipídios e proteínas (ANDRADE *et al.*, 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a suscetibilidade *in vitro* de *Candida glabrata*, sensíveis e resistentes ao fluconazol, frente a óleos essenciais extraídos de condimentos.

3.2 Objetivos Específicos

1) Verificar, através da determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM), a atividade fungistática dos óleos essenciais de canela, orégano, orégano mexicano, manjerição, alecrim, sálvia, tomilho e gengibre, frente a isolados de *Candida glabrata*, sensíveis e resistentes ao fluconazol.

2) Determinar a Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos mesmos óleos essenciais acima citados, frente a isolados de *C. glabrata*, sensíveis e resistentes ao fluconazol.

3) Comparar, através das CIMs, a suscetibilidade de *C. glabrata*, sensíveis e resistentes ao fluconazol, frente a óleos essenciais extraídos de condimentos.

4) Comparar, através das CFMs, a suscetibilidade de *C. glabrata*, sensíveis e resistentes ao fluconazol, frente a óleos essenciais extraídos de condimentos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Micro-organismos

Foram utilizados 72 isolados de *C. glabrata*, distribuídos em dois grupos: o primeiro incluindo 36 isolados primariamente sensíveis ao fluconazol, pertencentes à coleção de fungos do Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). O segundo grupo formado por 36 isolados oriundos do primeiro, após indução da resistência ao fluconazol pela técnica de indução de resistência *in vitro* proposta por Fekete-Forgács *et al.* (2000).

4.2 Óleos essenciais

Avaliou-se a atividade antifúngica de óleos essenciais obtidos de condimentos conforme a descrição no quadro abaixo.

Quadro 1 – Relação das espécies vegetais das quais foram obtidos os óleos essenciais estudados.

Nome científico	Nome popular
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn	Canela
<i>Lippia graveolens</i> HBK	Orégano mexicano
<i>Ocimum basilicum</i> L.	Manjeriçã
<i>Origanum vulgare</i> L.	Orégano
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Alecrim
<i>Salvia officinalis</i> L.	Sálvia
<i>Thymus vulgaris</i> L.	Tomilho
<i>Zingiber</i> sp.	Gengibre

4.2.1 Obtenção dos óleos essenciais

Os óleos essenciais de orégano, alecrim e tomilho foram adquiridos comercialmente da empresa Essencial 7 (Roswell, NM, EUA). O óleo de orégano mexicano foi adquirido da empresa Agroindustrial Don Pablo (Chihuahua, Chih., México), e o de canela, da empresa Fuchs Gewurze do Brasil LTDA (Itupeva, SP, Brasil).

4.3 Indução de resistência ao fluconazol *in vitro*

A indução de resistência ao fluconazol foi realizada *in vitro* utilizando-se a técnica descrita por Fekete-Forgács *et al.* (2000). As culturas de *C. glabrata* sensíveis ao fluconazol foram semeadas em tubos contendo Caldo Sabouraud e incubadas a 30°C “overnight”. Os inóculos de cada tubo foram, a seguir, padronizados em novos cultivos com Caldo Sabouraud com base na turvação ajustada em espectrofotômetro para absorvância 0,1 no $\lambda = 640$ nm. Os cultivos com densidade de inóculo padronizado foram incubados a 30°C e, após 10 horas, foi acrescentado fluconazol resultando na concentração final de 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Decorridas 14 horas de incubação, as células das culturas contendo fluconazol foram novamente transferidas para tubos contendo Caldo Sabouraud e fluconazol 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e novamente, incubadas a 30°C sob agitação de 120 rpm, durante 24 horas. Este procedimento foi realizado por 3 vezes consecutivas. Após a terceira incubação, as células foram transferidas para novos tubos contendo Caldo Sabouraud e fluconazol na concentração final de 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a fim de que se obtivesse, em espectrofotômetro, uma absorvância final de 0,1 no $\lambda = 640$ nm. Depois de 10 horas de incubação, foi adicionado fluconazol suficiente para obtenção de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de fluconazol. Os cultivos foram incubados a 30°C por 24 horas sob agitação. Continuou-se duplicando a concentração de fluconazol até que se atingisse a concentração de 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As células do cultivo final foram semeadas em Ágar Sabouraud e mantidas como estoque para os ensaios frente a *C. glabrata* fluconazol-resistentes. Foram necessários vinte dias de crescente exposição ao fluconazol para tornar as *Candidas glabratas* resistentes ao fluconazol.

4.4 Avaliação da atividade dos óleos essenciais frente a *C. glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol

Empregou-se a técnica de microdiluição em caldo, de acordo com as normas de padronização publicadas no documento M27-A3 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008). A metodologia foi adaptada substituindo-se os antifúngicos, descritos no documento M27-A3, pelos óleos essenciais. Os testes foram realizados em triplicata, utilizando placas de microtitulação com 96 poços.

4.4.1 Diluição dos óleos essenciais

Inicialmente, os óleos essenciais foram solubilizados em metanol originando uma solução estoque na concentração de 640000 µg/mL. A partir desta, realizou-se uma diluição 1:100 em meio RPMI 1640, a fim de se eliminar qualquer possibilidade de interferência do metanol na atividade antifúngica.

Desta forma, a maior concentração obtida de óleo essencial foi de 6400µg/mL, realizando-se, a partir desta, diluições seriadas a 1:2 também no meio RPMI 1640, obtendo-se as seguintes concentrações: 3200µg/mL, 1600µg/mL, 800µg/mL, 400µg/mL, 200µg/mL, 100µg/mL. Alíquotas de 100µL das sete concentrações diferentes de cada óleo essencial foram dispensadas, seqüencialmente, nas placas de microtitulação, sendo que as concentrações finais de cada óleo essencial testado, após a adição do inóculo, foram: 3200µg/mL, 1600µg/mL, 800µg/mL, 400µg/mL, 200µg/mL, 100µg/mL e 50µg/mL.

4.4.2 Preparação do inóculo

Realizou-se o cultivo das amostras de *Candida* a serem testadas em ágar Sabouraud dextrose a fim de assegurar sua pureza e viabilidade. Os cultivos foram incubados a 35°C durante 24/48 horas antes da realização dos ensaios. Após esse período, uma suspensão inicial dos micro-organismos foi obtida em água estéril ajustando-se a turvação em

espectrofotômetro a 90% de transmitância ($\lambda = 530\text{nm}$). Esta turvação é equivalente ao tubo nº 0,5 da escala MacFarland, correspondendo a $1 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ UFC/mL. As suspensões de trabalho (final) foram obtidas através de diluição a 1:50, em água estéril, da suspensão inicial, seguida por outra a 1:20 no caldo RPMI 1640. Após tais diluições, o inóculo passou a conter aproximadamente $1,0 \times 10^3$ a $5,0 \times 10^3$ UFC/mL. A concentração final do inóculo foi de $0,5 \times 10^3 - 2,5 \times 10^3$ UFC/mL, visto que, quando colocado na placa de microtitulação, o volume de caldo RPMI contendo o óleo essencial em estudo, determinou uma diluição 1:2.

4.4.3 Inoculação nas placas de microdiluição

Alíquotas de 100 μL do inóculo final foram adicionadas a cada poço das placas de microtitulação contendo 100 μL das sete diferentes concentrações dos óleos essenciais diluídos em RPMI, obtendo-se assim a concentração final desejada de óleo essencial e de inóculo.

Cada série de testes incluiu um controle de crescimento positivo do inóculo no meio RPMI 1640, sem agente antifúngico, para avaliar a viabilidade dos organismos testados; também se fez uso de controle negativo, que além de indicar a presença de contaminação no meio de cultura utilizado, auxiliava no controle da turbidez para a leitura das CIMs.

4.4.4 Incubação e leitura das microplacas

As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C, durante 48 horas.

Após o período de incubação, os controles de crescimento foram observados e, a seguir, registrava-se a CIM (concentração inibitória mínima) correspondente a menor concentração de óleo essencial capaz de inibir o crescimento fúngico.

4.4.5 Concentração fungicida mínima (CFM)

Alíquotas dos poços onde não foi evidenciado crescimento fúngico foram repicadas para placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose, sendo estas incubadas a 35 °C durante 48 horas.

A menor concentração de óleo essencial cujo subcultivo não gerou crescimento no meio de cultura foi considerada como CFM.

4.4.6 CIM₅₀ e CIM₉₀

Concentração Inibitória Mínima 50% (CIM₅₀): este parâmetro indica a menor concentração capaz de inibir 50% dos isolados.

Concentração Inibitória Mínima 90% (CIM₉₀): este parâmetro indica a menor concentração capaz de inibir 90% dos isolados.

4.5 Análise estatística

O teste de Mann Whitney (SIEGEL, 1981) foi empregado para comparar duas amostras independentes, visando observar se os diferentes grupos em estudo apresentavam perfis de suscetibilidade semelhantes ou não, frente a determinado óleo essencial. Este é um teste não-paramétrico, o qual foi escolhido porque os dados obtidos no presente estudo não satisfizeram as exigências de normalidade do teste *t* de Student.

Para $p \geq 0,05$, considerou-se que as diferenças observadas não eram significativas. Quando o teste calculado apresentou diferenças significativas [$p < 0,05$], utilizou-se um asterisco (*) para caracterizá-la; quando o teste calculado foi significativa para [$p < 0,01$] usou-se dois asteriscos (**).

5. RESULTADOS

5.1 Indução de resistência ao fluconazol *in vitro*

Para considerar *C. glabrata* resistente ao fluconazol, cada isolado deve exibir concentrações inibitórias mínimas iguais ou superiores a 64 µg/mL frente ao fluconazol. Os resultados da indução da resistência ao fluconazol, comparados aos isolados originais, estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1 - Suscetibilidade de *C. glabrata* frente ao fluconazol antes (Cg FS) e após (Cg FR) a exposição ao fluconazol.

Grupos de isolados	Média geométrica das CIMs (µg/mL)	Intervalo (µg/mL)	CIM ₅₀ (µg/mL)	CIM ₉₀ (µg/mL)
Cg (FS) (n=36)	4,61	1-32	4	32
Cg (FR) (n=36)	147,63	64-256	128	256

Cg (FS) = *Candida glabrata* Fluconazol Sensível; Cg (FR) = *Candida glabrata* Fluconazol Resistente; CIM₅₀ = Concentração inibitória mínima capaz de inibir 50% dos isolados do grupo testado; CIM₉₀ = Concentração inibitória mínima capaz de inibir 90% dos isolados do grupo testado.

5.2 Perfil de suscetibilidade de *C. glabrata*, sensíveis e resistentes ao fluconazol, frente a óleos essenciais extraídos de condimentos

Os perfis de suscetibilidade dos 72 isolados de *Candida glabrata*, expressos como CIM e CFM, foram determinados frente aos óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum* (canela), *Lippia graveolens* (orégano mexicano), *Ocimum basilicum* (manjeriço), *Origanum vulgare* (orégano), *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Salvia officinalis* (sálvia), *Thymus vulgaris* (tomilho) e *Zingiber officinale* (gengibre) (Tabela 2).

Com relação à atividade antifúngica dos óleos essenciais estudados, pôde-se observar que os óleos de *O. basilicum*, *R. officinalis*, *Z. officinale*, *T. vulgaris* e *S. officinalis* não evidenciaram tal propriedade frente aos isolados desta espécie de *Candida* nas concentrações

testadas (Tabela 2). Entretanto, os óleos essenciais de *C. zeylanicum*, *L. graveolens*, *O. vulgare*, demonstraram diferentes níveis de atividade antifúngica.

5.2.1 Suscetibilidade de *C. glabrata* frente ao óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum*

Com base na CIMs, a faixa de suscetibilidade dos 72 isolados de *Candida glabrata* sensíveis ao fluconazol frente ao óleo essencial de canela evidenciou variações de 400 µg/mL a 3200 µg/mL, e a faixa de suscetibilidade dos 36 isolados de *C. glabrata* resistentes ao fluconazol frente ao mesmo óleo essencial evidenciou variações de 800 µg/mL a 3200 µg/mL (Tabela 2). Considerando a CIM₅₀, *C. glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol foram inibidas pela concentração de 3200 µg/mL e 1600µg/mL, respectivamente. Quanto às médias geométricas com base nas CIMs, o valor para *C. glabrata* sensíveis ao fluconazol foi de 2796,5 µg/mL e para *C. glabrata* resistentes ao fluconazol 1569,5 µg/mL de óleo essencial (Tabela 2).

Em relação as CFMs, a menor concentração requerida foi 800 µg/mL e a maior concentração foi >3200 µg/mL para ambos os grupos. Quanto às médias geométricas observaram-se variações entre 3200 µg/mL e 2055 µg/mL, para *C. glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol, respectivamente.

As comparações dos perfis de suscetibilidade entre os diferentes grupos de *Candida glabrata*, frente ao óleo essencial de canela, foram avaliadas pelo teste estatístico de Mann Whitney (Tabela 3). As diferenças encontradas nas análises realizadas foram que, tanto pelas CIMs como pelas CFMs, os isolados de *C. glabrata* resistentes ao fluconazol mostraram-se significativamente mais suscetíveis ao óleo essencial de canela do que os isolados de *C. glabrata* sensíveis ao fluconazol ($p < 0,0001^{**}$).

5.2.2 Suscetibilidade de *C. glabrata* frente ao óleo essencial de *Lippia graveolens*

A atividade antifúngica do óleo essencial de orégano mexicano, expressa em CIMs, frente aos 72 isolados de *Candida glabrata*, sensíveis e resistentes ao fluconazol, evidenciou

variações de 400 µg/mL a >3200 µg/mL (Tabela 2). Considerando a CIM₅₀, observaram-se concentrações de 3200 µg/mL de óleo essencial tanto para *C. glabrata* sensíveis ao fluconazol como para *C. glabrata* resistentes ao fluconazol. Ao analisar os valores de CIM₉₀, observou-se o valor de 3200 µg/mL para o grupo sensível ao fluconazol e >3200 µg/mL para o grupo resistente ao fluconazol, e as médias geométricas referentes as CIMs foram de 2351,6 µg/mL para *C. glabrata* sensíveis ao fluconazol e 2906,3 µg/mL para *C. glabrata* resistentes ao fluconazol. Em relação às CFMs, a concentração observou-se variação entre 1600 µg/mL e >3200 µg/mL.

A Tabela 3 apresenta os resultados da comparação entre os perfis de suscetibilidade dos diferentes grupos de *Candida glabrata* frente ao óleo essencial de *Lippia graveolens* obtidos pelo teste estatístico de Mann Whitney. Com base nas CIMs, *C. glabrata* sensíveis ao fluconazol foram significativamente mais sensíveis ao óleo essencial de orégano mexicano do que *C. glabrata* resistentes ao fluconazol ($p=0,0246^*$). Já pelas CFMs não houve diferença significativa entre os grupos sensível e resistente ao fluconazol.

5.2.3 Suscetibilidade de *C. glabrata* frente ao óleo essencial de *Origanum vulgare*

Os valores de CIMs de óleo essencial de orégano obtidos frente aos 72 isolados de *Candida glabrata*, sensíveis e resistentes ao fluconazol, evidenciaram variações, respectivamente, de 400 µg/mL a 1600 µg/mL e 800 µg/mL a 1600 µg/mL (Tabela 2). Ao considerar CIM₅₀ e CIM₉₀ foram requeridas, respectivamente, concentrações de 800 µg/mL e 1600 µg/mL, tanto para o grupo sensível como para o grupo resistente ao fluconazol. Considerando as médias geométricas com base nas CIMs, foram evidenciadas variações entre 815,6 µg/mL para *C. glabrata* sensíveis ao fluconazol e 1047,5 µg/mL para *C. glabrata* resistentes ao fluconazol.

Em relação às CFMs, os intervalos obtidos foram de 400 µg/mL a 3200 µg/mL para *C. glabrata* sensíveis ao fluconazol e 800 µg/mL a 3200 µg/mL para isolados resistentes ao fluconazol, sendo que as médias geométricas observadas foram de 1088,6 µg/mL e 1830,9 µg/mL para *C. glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol, respectivamente.

A Tabela 3 demonstra os resultados obtidos pelo teste estatístico de Mann Whitney quando comparados os perfis de suscetibilidade entre os diferentes grupos de *Candida glabrata*, frente ao óleo essencial de orégano. Das comparações estabelecidas, foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas CIMs ($p=0,0345^*$) e CFMs ($p<0,0001^{**}$), onde *C. glabrata* sensíveis ao fluconazol foram mais sensíveis ao óleo essencial de orégano do que *C. glabrata* resistente ao fluconazol. O óleo essencial de orégano, comparado aos outros óleos essenciais, foi o mais eficiente tanto em relação às CIMs como em relação às CFMs.

Tabela 2 - Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum*, *Lippia graveolens*, *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, *Thymus vulgaris* e *Zingiber sp.* frente a *C. glabrata* sensível e resistente ao fluconazol.

	OES	Faixa	CIM ($\mu\text{g/mL}$)			CFM ($\mu\text{g/mL}$)			MG
			CIM ₅₀	CIM ₉₀	MG	Faixa	CFM ₅₀	CFM ₉₀	
Cg (FS)	Cz	400-3200	3200	3200	2796,5	800->3200	3200	>3200	3200,0
	Lg	400->3200	3200	3200	2351,6	1600->3200	3200	>3200	3390,0
	Ob	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200
	Ov	400-1600	800	1600	815,6	400-3200	800	3200	1088,6
	Ro	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200
	So	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200
	Tv	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200
	Z	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200
Cg (FR)	Cz	800-3200	1600	3200	1569,5	800->3200	1600	3200	2055,0
	Lg	400->3200	3200	>3200	2906,3	1600->3200	3200	>3200	3390,3
	Ob	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200
	Ov	800-1600	800	1600	1047,5	800-3200	1600	3200	1830,9
	Ro	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200
	So	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200
	Tv	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200
	Z	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200

Cg (FS) = *Candida glabrata* Fluconazol Sensível; Cg (FR) = *Candida glabrata* Fluconazol Resistente; CIM = Concentração Inibitória Mínima Total; CFM = Concentração Fungicida Mínima; CIM₅₀ = Concentração Inibitória Mínima capaz de inibir o crescimento de 50% dos isolados; CIM₉₀ = Concentração Inibitória Mínima capaz de inibir o crescimento de 90% dos isolados; CFM₅₀ = Concentração Fungicida Mínima para 50% dos isolados; CFM₉₀ = Concentração Fungicida Mínima para 90% dos isolados; MG = Média Geométrica; OES = Óleos Essenciais; Cz = *Cinnamomum zeylanicum*; Lg = *Lippia graveolens*; Ob = *Ocimum basilicum*; Ov = *Origanum vulgare*; Ro = *Rosmarinus officinalis*; So = *Salvia officinalis*; Tv = *Thymus vulgaris*; Z = *Zingiber sp.*

Tabela 3 - Valores de P na comparação das CIMs e CFMs dos óleos essenciais de canela, orégano e orégano mexicano frente grupos de *C. glabrata*, sensíveis e resistentes ao fluconazol.

Comparações entre grupos	Teste	Valores P ^a		
		Canela	Orégano	Orégano Mexicano
Cg (FS) x Cg (FR)	CIM	<0.0001** [Cg (FS) > Cg (FR)]	0,0345* [Cg (FS) < Cg (FR)]	0,0246* [Cg (FS) < Cg (FR)]
	CFM	<0.0001** [Cg (FS) > Cg (FR)]	<0.0001** [Cg (FS) < Cg (FR)]	0,1261

Cg (FS) = *Candida glabrata* Fluconazol Sensível; Cg (FR) = *Candida glabrata* Fluconazol Resistente; CIM = Concentração Inibitória Mínima; CFM = Concentração Fungicida Mínima.

^aValores de P obtidos pelo teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney

*Teste calculado foi significativo com P<0,05

**Teste calculado foi significativo com P<0,01

5.3 Comparação das atividades dos óleos essenciais frente a *C. glabrata* sensíveis (Cg FS) e resistentes (Cg FR) ao fluconazol, com base nas CIMs e CFMs

Considerando as CIM e CFM, de modo geral, o óleo essencial de orégano demonstrou os menores valores frente a todos os isolados, seguido pelo óleo essencial de canela e pelo óleo essencial de orégano mexicano. O grupo de *C. glabrata* resistente ao fluconazol não apresentou diferença significativa quanto à CFM de óleos essenciais de orégano e canela. Quanto a CIM, o óleo essencial de orégano demonstrou melhor atividade para ambos os grupos de *C. glabrata* testados ($p < 0,001$); já o óleo essencial de orégano mexicano apresentou menor CIM que o óleo essencial de canela para *C. glabrata* sensíveis ao fluconazol ($p = 0,0523$), no entanto, para os isolados resistentes ao fluconazol o óleo essencial de orégano mexicano apresentou significativamente menor atividade que o óleo essencial de canela ($p < 0,0001$). Observando-se CFM, *C. glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol apresentam-se significativamente mais suscetíveis ao óleo essencial de orégano quando comparado ao óleo essencial de orégano mexicano ($p < 0,0001$); o óleo essencial de canela apresentou atividade maior contra isolados resistentes ao fluconazol, sendo neste grupo a CFM de óleo essencial de canela menor que a CFM de óleo essencial de orégano; porém para o grupo de *C. glabrata* sensíveis ao fluconazol a CFM de óleo essencial de canela é estatisticamente igual a CFM de óleo essencial de orégano mexicano ($p = 0,2723$).

Tabela 4 - Valores de P na comparação da atividade antifúngica, com base nas CIMs e CFMs, dos óleos essenciais frente isolados de *C. glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol utilizando valores de probabilidade obtidos pelo teste de Mann-Whitney.

Comparações entre OES	Teste	Valores P ^a	
		Cg (FS)	Cg (FR)
<i>Cz</i> x <i>Ov</i>	CIM	<0.0001** (<i>Cz</i> > <i>Ov</i>)	0,0002** (<i>Cz</i> > <i>Ov</i>)
	CFM	<0.0001** (<i>Cz</i> > <i>Ov</i>)	0,3250
<i>Cz</i> x <i>Lg</i>	CIM	0,0523	0,0001** (<i>Cz</i> < <i>Lg</i>)
	CFM	0,2723	0,0016** (<i>Cz</i> < <i>Lg</i>)
<i>Ov</i> x <i>Lg</i>	CIM	<0.0001** (<i>Ov</i> < <i>Lg</i>)	<0.0001** (<i>Ov</i> < <i>Lg</i>)
	CFM	<0.0001** (<i>Ov</i> < <i>Lg</i>)	0,0001** (<i>Ov</i> < <i>Lg</i>)

Cg (FS) = *Candida glabrata* Fluconazol Sensível; Cg (FR) = *Candida glabrata* Fluconazol Resistente; CIM = Concentração Inibitória Mínima; CFM = Concentração Fungicida Mínima; *Cz* = *Cinnamomum zeylanicum*; *Lg* = *Lippia graveolens*; *Ov* = *Origanum vulgare*.

**Teste calculado foi significativo com $P < 0,01$

6 DISCUSSÃO

A candidíase é a infecção fúngica oportunista mais importante no ambiente hospitalar. *Candida* é o terceiro patógeno mais comumente isolado de infecções sanguíneas nos EUA, sendo menos freqüente apenas que *Staphylococcus* coagulase negativa e *Staphylococcus aureus*. Nos países da Europa espécies de *Candida* estão entre o sexto e nono mais frequente micro-organismo isolado de infecções sanguíneas (MARCHETTI *et al.*, 2004; SPELLBERG *et al.*, 2006). O mais preocupante a respeito das candidemias é que estão associadas a altas taxas de mortalidade, morbidade e maior período de hospitalização (MARCHETTI *et al.*, 2004). Os principais fatores de risco para candidíase disseminada são os procedimentos invasivos, tratamento imunossupressivo e uso de antimicrobianos de amplo espectro (SPELLBERG *et al.*, 2006). Infecção pelo HIV e *diabetes mellitus* são fatores que predispõem principalmente a candidíase mucocutânea, como da orofaringe ou vulvovaginal as quais estão associadas a severa morbidade e podem ser também foco de disseminação em pacientes imunocomprometidos (ALLY *et al.*, 2001; SPELLBERG *et al.*, 2006; HOLANDA *et al.*, 2007). Nos EUA e em muitos países da Europa, *Candida glabrata* é a segunda espécie mais isolada depois de *Candida albicans* (MARCHETTI *et al.*, 2004; SPELLBERG *et al.*, 2006). As infecções por esta espécie estão associadas a menor suscetibilidade ao fluconazol e a altas taxas de mortalidade; Pfaller *et al.* (2009) demonstram que *C. glabrata* foi responsável por 19-34% dos episódios de candidemias no EUA no período de 2001 a 2007, com 14% dos isolados resistentes ao fluconazol; Pai *et al.* (2006) relatam mortalidade de 36,4% para infecções no sangue causadas por *C. glabrata* no período de 2002 a 2005. No Brasil, a incidência de *C. glabrata* é considerada baixa, responsável por 4,9% das infecções sistêmicas essa espécie ocupa o 5º lugar entre os agentes causadores de candidemias (COLOMBO *et al.*, 2006). Diferentes fatores parecem estar envolvidos na prevalência desta espécie, incluindo características geográficas, idade do paciente e população de pacientes estudados. O frequente uso de fluconazol como tratamento ou profilaxia parece estar envolvido no aumento da freqüência de isolados de *C. glabrata* como agente etiológico de candidemias em pacientes hospitalizados, assim como no aumento da resistência secundária ao fluconazol e a outros azólicos (MALANI *et al.*, 2005; PFALLER *et al.*, 2009; PANACKAL *et al.*, 2006). Desta forma, novas propostas terapêuticas contra candidíase tornaram-se um importante alvo de pesquisas.

Várias publicações têm documentado a atividade antimicrobiana de óleos essenciais e extratos de plantas (HAMMER *et al.*, 1999; DORMAN & DEANS, 2000; CORREA-ROYERO *et al.*, 2010). Óleos essenciais são constituídos por uma mistura de componentes caracterizados por sua capacidade flavorizante e aromática, entre esses componentes os terpenóides (hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos e seus derivados) são os mais abundantes, sendo que muitos terpenos sabidamente apresentam atividade antimicrobiana (INOUYE *et al.*, 2005; TROMBETTA *et al.*, 2005). Outros metabólitos secundários de origem vegetal são também encontrados e a constituição dos óleos essenciais é influenciada pelas características genéticas da planta e por fatores ambientais, assim o sinergismo entre terpenos e outros constituintes do óleo essencial devem ser considerados na avaliação da atividade antimicrobiana (IMELOUANE *et al.*, 2009). O mecanismo antimicrobiano dos óleos essenciais não está totalmente esclarecido. Acredita-se que a lipofilia de seus constituintes permita a partição destes compostos nos lipídeos da membrana celular e da mitocôndria causando o aumento da permeabilidade e levando ao extravasamento do conteúdo celular (COWAN, 1999). Alguns autores também sugerem que os componentes dos óleos essenciais poderiam agir sobre proteínas da membrana citoplasmática, distorcendo a interação lipídeo-proteína de enzimas como a ATPase que está localizada na membrana plasmática e rodeada de moléculas lipídicas (SIKKEMA *et al.*, 1995).

Os testes e avaliações da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais podem ser dificultados pela volatilidade do óleo, sua insolubilidade em água e sua complexidade química. Para realizar testes *in vitro* que visam verificar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais, é necessário definir e adotar uma metodologia adequada e bem padronizada, levando em consideração fatores como a técnica usada, o meio de cultura, a densidade do inóculo, o óleo essencial e o emulsificador utilizado (NASCIMENTO *et al.*, 2007). Os métodos de diluição em caldo são mais adequados para testar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais. Técnicas de difusão em ágar podem apresentar difusão irregular dos componentes lipófilos dos óleos essenciais resultando em concentrações desiguais no ágar e formação de regiões com atividade antimicrobiana variável (HAMMER *et al.*, 1999). Outro fator favorável à diluição em caldo é que o RPMI 1640, meio preconizado pelo CLSI nesta técnica, é quimicamente definido e, por isso, não tem evidenciado interação com agentes antifúngicos, podendo ser também seguramente utilizado em ensaios com óleos essenciais.

6.1 Perfil de suscetibilidade de *C. glabrata*, sensíveis e resistentes ao fluconazol, frente aos óleos essenciais de *Ocimum basilicum* (manjeriço), *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Salvia officinalis* (sálvia), *Thymus vulgaris* (tomilho) e *Zingiber sp.* (gingibre)

Os óleos essenciais de manjeriço, alecrim, sálvia, tomilho e gengibre não demonstraram atividade antifúngica *in vitro* nas concentrações testadas. Pozzatti *et al.* (2008) também observaram que os óleos essenciais de manjeriço, alecrim, sálvia e gengibre não demonstraram atividade antifúngica frente a isolados de *C. glabrata*, e entre esses óleos essenciais apenas o de gengibre evidenciou atividade frente outras espécies de *Candida*. Esses resultados contrariam o estudo de alguns autores que evidenciaram a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de manjeriço (SOLIMAN & BADEAA, 2002; HANIF *et al.*, 2011), alecrim (LIMA *et al.*, 2006; GACHKAR *et al.*, 2007; MANGENA & MUYIMA, 1999), sálvia (BARRA & VALENTTI, 1998; PEREIRA *et al.*, 2004) e gengibre (ANDRADE *et al.*, 2012). É importante lembrar que a grande maioria dos estudos emprega a técnica de difusão em ágar, que, conforme já referido, impede comparações mais rigorosas com resultados de estudos realizados através de microdiluição em caldo (HILI *et al.*, 1997; NASCIMENTO *et al.*, 2007).

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de tomilho parece depender da presença de alguns constituintes (IMELOUANE *et al.*, 2009). Faleiro *et al.* (2002) estudaram a atividade antimicrobiana de algumas espécies de *Thymus* cultivadas em diferentes locais de Portugal. Os óleos essenciais de tais espécies demonstraram variadas atividades antimicrobianas, indicando que o espectro de ação do óleo essencial está relacionado aos seus constituintes e aos micro-organismos testados. Em pesquisa realizada por Pina-Vaz *et al.* (2004) foi evidenciada atividade antifúngica de óleos essenciais de *Thymus* frente a diferentes espécies de *Candida* (incluindo *C. glabrata*), sendo demonstrado que os óleos essenciais de *Thymus zygis* e *Thymus vulgaris* que apresentavam carvacrol, timol e p-cimeno como constituintes majoritários demonstraram atividade superior a *Thymus mastichina*, o qual apresentou 1,8-cineol como componente majoritário. No presente estudo, o óleo essencial de tomilho não evidenciou atividade antifúngica frente a *C. glabrata*. É importante destacar que ao testar atividade antimicrobiana de óleos essenciais deve-se levar em consideração as dificuldades de comparar os resultados obtidos na pesquisa com os dados existentes na literatura. Isto porque a composição química dos óleos essenciais pode variar dentro da mesma espécie devido à presença de quimiotipos, a época da colheita, a diferentes métodos de

extração, entre outros (SIMÕES *et al.*, 1999). Além do mais, é importante considerar a metodologia empregada para avaliação da atividade antifúngica, bem como a suscetibilidade original dos micro-organismos utilizados.

Os óleos essenciais de canela, orégano mexicano e orégano evidenciaram significativa atividade antifúngica. Diante disto, foram determinados os valores de CIM₅₀ e CIM₉₀, ou seja, concentração mínima de óleo essencial capaz de inibir o crescimento de 50% e 90% dos isolados, respectivamente. Considerando as CIM₅₀ e CIM₉₀, de modo geral, o óleo essencial de orégano foi efetivo nas menores concentrações, seguido pela canela e pelo orégano mexicano.

6.2 Perfil de suscetibilidade de *C. glabrata* ao óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* (canela)

O óleo essencial de canela evidenciou atividade antifúngica frente a *C. glabrata* com CIM entre de 400 µg/mL e 3200 µg/mL. Esses valores são mais elevados que os encontrados por Jantan *et al.* (2008) que evidenciaram CIM de 310 µg/mL e 160 µg/mL para os óleos essenciais obtido das folhas e da casca do tronco de *Cinnamomum zeylanicum*, respectivamente. No mesmo estudo, Jantan *et al.* (2008) demonstraram que *C. glabrata* foi suscetível a 13 compostos normalmente encontrados em espécies de *Cinnamomum*, sendo que a menor CIM foi observada para o cinamaldeído, o qual apresentou-se como componente majoritário do óleo essencial obtido da casca do tronco de *C. zeylanicum*. Óleos essenciais de espécies de *Cinnamomum* que não apresentaram cinamaldeído evidenciaram CIM mais altas, porém a atividade antifúngica estava igualmente presente e foi atribuída a compostos como eugenol, metil (E)-cinamato, linalol, terpinen-4-ol, metil eugenol, α -terpineol, benzil benzoato, benzil salicilato, assim como ao efeito sinérgico entre eles e os componentes minoritários.

Foram observadas diferenças significativas pela CIM, onde os isolados de *C. glabrata* resistentes ao fluconazol evidenciaram maior sensibilidade ao óleo essencial de canela do que os de *C. glabrata* sensíveis ao fluconazol ($p < 0,0001$). Da mesma forma, com base na CFM, o grupo de *C. glabrata* resistente ao fluconazol mostrou-se mais suscetível ao óleo essencial de canela quando comparado ao grupo de *C. glabrata* sensível ao fluconazol ($p < 0,0001$). O mecanismo de resistência de *C. glabrata* aos azólicos envolve o aumento de efluxo do

antifúngico, diminuindo assim a concentração da droga no interior da célula (BENNETT *et al.*, 2004). No grupo de *C. glabrata* fluconazol resistente é sabido que o efluxo esta presente. Todavia, a maior suscetibilidade deste grupo aos óleos essenciais sugere que tal mecanismo de resistência não envolve os óleos essenciais.

6.3 Perfil de suscetibilidade de *C. glabrata* ao óleo essencial de *Lippia graveolens* (orégano mexicano)

O óleo essencial de orégano mexicano evidenciou atividade antifúngica frente a *C. glabrata* com CIMs entre de 400 µg/mL e >3200 µg/mL. Com relação as CFMs foram encontrados valores de média geométrica muito próximos para *C. glabrata* sensíveis e resistentes aos fluconazol, respectivamente 3390,0 µg/mL e 3390,3 µg/mL. Essas concentrações foram superiores as encontradas por Pozzatti *et al.* (2008) que observaram que o óleo essencial de orégano mexicano frente a isolados de *C. glabrata* apresentou CIM e CFM com valores que variaram entre 400 µg/mL e 800 µg/mL. No entanto, é importante considerar que Pozzatti *et al.* (2008) estudaram apenas um pequeno grupo de *C. glabrata*, formado por quatro isolados classificados como intrinsecamente resistentes ao fluconazol, e que tanto no estudo de Pozzatti *et al.* (2008) como neste foram observadas CIM tão baixas quanto 400 µg/mL, mas em um grupo mais significativo isolados de *C. glabrata* menos suscetíveis ao óleo essencial de orégano mexicano também estavam representados. Comparando os grupos sensíveis e resistentes ao fluconazol, pode-se afirmar que foram observadas diferenças significativas pela CIM, onde os isolados de *C. glabrata* sensível ao fluconazol evidenciaram maior sensibilidade ao óleo essencial de orégano mexicano do que os isolados resistentes ao fluconazol ($p=0,0246$). Quanto a CFM, não foram observadas diferenças significativas, entre os grupos.

6.4 Perfil de suscetibilidade de *C. glabrata* ao óleo essencial de *Origanum vulgare* (orégano)

O óleo essencial de orégano evidenciou atividade antifúngica frente a *C. glabrata* com CIM entre 400 µg/mL e 1600 µg/mL para o grupo sensível ao fluconazol, e entre 800 µg/mL e 1600 µg/mL para o grupo resistente ao fluconazol. As médias geométricas referentes à CIM foram 815,6 µg/mL e 1047,5 µg/mL para *C. glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol, respectivamente. Khosravi *et al.* (2011) evidenciaram inibição completa do crescimento de *C. glabrata* em concentrações mais baixas do óleo essencial de orégano, observando valores entre 0,5 µg/mL e 1100 µg/mL, e concentração média igual a 340,2 µg/mL. Cleff *et al.* (2010) evidenciaram a atividade antifúngica do óleo essencial de orégano frente a diferentes espécies de *Candida* e atribuíram essa atividade a alta concentração de monoterpenos fenólicos encontrados no óleo essencial estudado. O óleo essencial de orégano evidenciou atividade antimicrobiana frente a *Candida albicans* em estudo realizado por Manohar *et al.* (2001); os mesmos autores avaliaram também a eficácia terapêutica do óleo essencial de orégano *in vivo*, observando que, no grupo de animais infectados com *C. albicans* e que recebera óleo essencial de orégano, a taxa de sobrevivência foi maior do que no grupo que recebeu óleo de oliva. Estes achados sinalizam para a necessidade do desenvolvimento de novos estudos *in vivo*, utilizando óleo essencial de orégano para o estabelecimento de parâmetros como segurança terapêutica e adequação do uso clínico.

Comparando a suscetibilidade dos grupos sensíveis e resistentes ao fluconazol, *C. glabrata* sensível ao fluconazol evidenciou maior sensibilidade ao óleo essencial de orégano ($p=0,0345$). Os valores médios observados para CFM foram 1088,6 µg/mL e 1830,9 µg/mL para os isolados sensíveis e resistentes ao fluconazol, respectivamente. Sob este parâmetro *C. glabrata* sensível ao fluconazol também se mostrou significativamente mais suscetível ao óleo essencial de orégano ($p<0,0001$).

6.5 Considerações finais

O interesse pela medicina natural aumentou notavelmente nos últimos anos como consequência aos efeitos colaterais de drogas convencionais, bem como pela emergência da

resistência antimicrobiana aos fármacos disponíveis. Os estudos objetivados a avaliar a atividade antimicrobiana de produtos de origem vegetal (extratos, óleos essenciais, frações majoritárias) avaliam, via de regra, fungos como *Saccharomyces cerevisiae* (modelo) ou *Candida albicans*. Sob a ótica da suscetibilidade dos fungos aos agentes antimicrobianos, *C. albicans* e *S. cerevisiae* não apresentam problemas de resistência; cabe aqui ressaltar que as falhas terapêuticas nas candidíases por *C. albicans* devem-se mais aos fatores do hospedeiro (imunossupressão) do que à suscetibilidade do fungo. Por outro lado, as candidíases causadas por *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. lusitaniae* constituem-se em episódios em que a resistência é um desafio. Neste contexto, entendemos que a abordagem da atividade antifúngica de óleos essenciais deveria ser melhor avaliada em *C. glabrata*, incluindo-se isolados comprovadamente resistentes ao fluconazol.

Com base nos resultados obtidos no presente estudo pode-se constatar a atividade antifúngica *in vitro* de óleos essenciais de condimentos frente a *Candida glabrata*, sensíveis e resistentes ao fluconazol. Dentre os óleos essenciais estudados, os óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum*, *Lippia graveolens* e *Origanum vulgare*, podem representar uma opção para a pesquisa e o desenvolvimento de produtos alternativos, que sejam eficientes no tratamento de candidíases causadas por espécies menos suscetíveis ou resistentes ao fluconazol. São necessárias pesquisas adicionais abordando a atividade antimicrobiana das frações majoritárias, o sinergismo entre diferentes óleos essenciais e entre óleos essenciais e agentes antifúngicos, e que incluam, além de *C. glabrata*, outras espécies fúngicas oportunistas.

7 CONCLUSÕES

1) Os óleos essenciais de canela, orégano e orégano mexicano evidenciaram atividade antifúngica frente aos isolados de *C. glabrata*, sensíveis e resistentes ao fluconazol.

2) Verificou-se que os óleos essenciais de manjeriço, alecrim, sálvia, tomilho e gengibre não evidenciaram atividade antifúngica frente aos isolados de *C. glabrata*, nas condições testadas.

3) De um modo geral, o óleo essencial de orégano apresentou atividade fungistática (CIM) e fungicida (CFM) superior aos óleos essenciais de canela e orégano mexicano.

4) De um modo geral, o óleo essencial de orégano mexicano apresentou atividade fungistática (CIM) e fungicida (CFM) inferior aos óleos essenciais de orégano e canela.

5) O grupo de *C. glabrata* sensíveis ao fluconazol mostrou-se menos suscetível ao óleo essencial de canela e mais suscetível aos óleos essenciais de orégano e orégano mexicano quando comparado ao grupo de *C. glabrata* resistente ao fluconazol.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLY, R.; SCHUMANN, D.; KREISEL, W.; CAROSI, G.; AGUIRREBENGOA, K.; DUPONT, B.; HODGES, M.; TROKE, P.; ROMERO, A. J.; ESOPHAGEAL CANDIDIASIS STUDY GROUP. A randomized, double-blind, double-dummy, multicenter trial of voriconazole and fluconazole in the treatment of esophageal candidiasis in immunocompromised patients. **Clinical Infectious Diseases**, v.33, p.1447-1454, 2001.

ANDRADE, M. A.; CARDOSO, M. G.; BATISTA, L. R.; MALLET, A. C. T.; MACHADO, S. M. F. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidantes e antibacterianas. **Revista Ciência Agrônômica**, v.43, n.2, p.399-408, 2012.

ARAUJO, C. R.; MIRANDA, K. C.; PASSOS, X. S.; SOUZA, L. K. H.; LEMOS, J. A.; KHRAIS, C. A.; COSTA, C. R.; SILVA, M. R. R.; FERNANDES, O. F. L. Identificação das leveduras do gênero *Candida* por métodos manuais convencionais e pelo método cromógeno CHROMagar™ *cândida*. **Revista de Patologia Tropical**, v.34, n.1, p.37-42, 2005.

BARRA, M. T. F.; VANETTI, M. C. D. Estudo da atividade antibacteriana de plantas medicinais, aromáticas e corantes naturais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.7-8, n.1, p.22-34, 1998.

BENNETT, J. E.; IZUMIKAWA, K.; MARR, K. A. Mechanism of increased fluconazole resistance in *Candida glabrata* during prophylaxis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, n.5, p.1773-1777, 2004.

BORST, A.; RAIMER, M. T.; WARNOCK, D. W.; MORRISON, C. J.; ARTHINGTON-SKAGGS. Rapid acquisition of stable azole resistance by *Candida glabrata* isolates obtained before the clinical introduction of fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, n.2, p.783-787, 2005.

BRASIL. **Resolução** n.12 - CNNPA, de 24 de julho de 1978. A CNNPA do Ministério da Saúde aprova 47 padrões de identidade e qualidade relativos a alimentos e bebidas para serem seguidos em todo território brasileiro. **Diário Oficial da União**, p.11499, 24 de julho de 1978, Seção 1.

BRIALAND, J.; ESSIG, D.; JACKSON, C.; FRANK, D.; LOEBENBERG, D.; MENZEL, F.; ARNOLD, B.; DOMENICO, B.; HARE, R. Comparison of pathogenesis and host immune responses to *Candida glabrata* and *Candida albicans* in systemically infected immunocompetent mice. **Infection and Immunity**, v.69, n.8, p.5046-5055, 2001.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, n.03, p.223-253, 2004.

CANDIDO, R. C.; AZEVEDO, R. V. P.; KOMESU, M. C. Enzimotipagem de espécies do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.33, n.5, p.437-442, 2000.

CARSON, C. F.; HAMMER, A.; RILEY, T. V. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clinical Microbiology Reviews**, v.19, n.1, p.50-60, 2006.

CLEFF, M. B.; MEINERZ, A. R.; XAVIER, M.; SCHUCH, L. F.; MEIRELES, M. C. A.; RODRIGUES, R. A.; MELLO, J. R. B. *In vitro* activity of *Origanum vulgare* essential oil against *Candida* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, p.116-123, 2010.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard M27-A3**, Wayne, Pennsylvania, EUA, 2008.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUE'R, S. A.; SKAGGS, B. A.; MATTA, D. A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.8, p.2816-2823, 2006.

CORRÊA, P. R.; DAVID, P. R. S.; PERES, N. P.; CUNHA, K. C.; ALMEIDA, M. T.G. Caracterização fenotípica de leveduras isoladas da mucosa vaginal em mulheres adultas. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.31, n.4, p.177-181, 2009.

COSTA, A. C.; SANTOS, B. H. C.; SANTO FILHO, L. LIMA, E. O. Antibacterial activity of the essential oil of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) against bacterial multiresistant strain isolated from nosocomial patients. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.1B, p.236-241, 2009.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.4, p.564-582, 1999.

CROCCO, E. I.; MÍMICA, L. M. J.; MURAMATU, L. H.; GARCIA, C.; SOUZA, V. M.; RUIZ, L. R. B.; ZAITZ, C. Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade antifúngica *in vitro*: estudo de 100 pacientes com candidíases superficiais. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.76, n.6, p.689-697, 2004.

DAL POZZO, M.; VIÉGAS, J.; SANTURIO, D. F.; ROSSATTO, L.; SOARES, I. H.; ALVES, S. H.; COSTA, M. M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus* spp isolados de mastite caprina. **Ciência Rural**, v.41, n.4, p.667-672, 2011.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.308-316, 2000.

FALEIRO, M. L.; MIGUEL, M. G.; LADEIRO, F.; VENÂNCIO, F.; TAVARES, R.; BRITO, J. C.; FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G. Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. **Letters in Applied Microbiology**, v.36, p.35-40, 2003.

FEKETE-FORGÁCS, K.; GYURC, L.; LENKEY, B. Changes of virulence factors accompanying the phenomenon of induced fluconazole resistance in *Candida albicans*. **Mycoses**, v.43, p.273-279, 2000.

FERRARI, S.; SANGUINETTI, M.; BERNARDIS, F.; TORELLI, R.; POSTERANO, B.; VANDEPUTTE, P.; SANGLARD, D. Loss of mitochondrial functions associated with azole resistance in *C. glabrata* results in enhanced virulence in mice. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.55, n.5, p.1852-1860, 2011.

FIDEL, P.L. JR; VAZQUEZ, J. A.; SOBEL J. D. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.1, p.80-96, 1999.

FIGUEROA, R. B. G.; SANTIBÁÑEZ, J. A.; KUBA, E. B.; TRUJILLO, A. B. *Candida glabrata*: an emergent opportunist in vulvovaginitis. **Cirurgia y Cirujanos**, v.77, n.6, p.423-427, 2009.

FRANÇA, J. C. B.; RIBEIRO, C. E. L.; TELLES, F. Q. Candidemia em um hospital terciário brasileiro: incidência, frequência das diferentes espécies, fatores de risco e suscetibilidade aos antifúngicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41, n.1, p.23-28, 2008.

GACHKAR, L.; YADEGARI, D.; REZAEI, M. B.; TAGHIZADEH, M.; ASTANEH, S. A.; RASOOLI, I. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. **Food Chemistry**, v.102, n.3, p.898-904, 2007.

GENDE, L. B.; FLORIS, I.; FRITZ, R.; EGUARAS, M. J. Antimicrobial activity of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oil and its mains components against *Paenibcillus larvae* from Argentine. **Bulletin of insectology**, v.61, n.1, p.1-4, 2008.

GRÉGIO, A. M. T.; FORTES, E. S. M.; ROSA, E. A. R.; SIMEONI, R. R.; Ação antimicrobiana do *Zingiber officinale* frente à microbiota bucal. **Estudos de biologia**, v.28, n.62, p.61-66, 2006.

GYGAX, S.; VERMITSKY, J. P.; CHADWICK, S. G.; SELF, M. J.; ZIMMERMAN, J. A. Antifungal resistance of *Candida glabrata* vaginal isolates and development of a quantitative reverse transcription-PCR-based azole susceptibility assay. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.52, n.9, p.3424-3426, 2008.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v.86, n.6, p.985-990, 1999.

HANIF, M. A.; MASKARI, M. Y.; MASKARI, A.; SHUKAILI, A.; SABAHI, J. N. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of unexplored *Omani basil*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.5, n.5, p.751-757, 2011.

HILI, P.; EVANS, C. S.; VENESS, R. G. Antimicrobial action of essential oils: the effect of dimethylsulphoxide on the activity of cinnamon oil. **Letters in Applied Microbiology**, v.24, p.269-275, 1997.

HOFFMANN, F. L.; SOUZA, S. J. F.; CRUZ, C. H. G.; VINTURIM, T. M.; DUTRA, A. L. Determinação da atividade antimicrobiana “in vitro” de quatro óleos essenciais de condimentos e especiarias. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.17, n.1, p.11-20, 1999.

HOLANDA, A. A. R.; FERNANDES, A. C. S.; BEZERRA, C. M.; FERREIRA, M. A. F.; HOLANDA, M. R. R.; HOLANDA, J. C. P.; MILAN, E. P. Candidíase vulvovaginal: sintomatologia, fatores de risco e colonização anal concomitante. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, vol.29, n.1, p.3-9, 2007.

IMELOUANE, B.; AMHAMDI, H.; WATHELET, J. P.; ANKIT, M.; KHEDID K.; EL BACHIRI, A. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of thyme (*Thymus vulgaris*) from eastern Morocco. **International Journal of Agriculture e Biology**, v.11, n.2, p.205-208, 2009.

INOUYE, S.; TAKIZAWA, T.; YAMAGUCHI, H. Antibacterial activity of essential oils and the major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.47, p.565-573, 2001.

JANTAN, I. B.; MOHARAM, A. K.; SANTHANAM, J.; JAMAL, J. A. Correlation between chemical composition and antifungal activity of the essential oils of eight *Cinnamomum* species. **Pharmaceutical Biology**, v.46, n.6, p.406-412, 2008.

KHOSRAVI, A. R.; SHOKRI, H.; KERMANI, S.; DAKHILI, M.; MADANI, M.; PARSA, S. Antifungal properties of *Artemisia sieberi* and *Origanum vulgare* essential oils against *Candida glabrata* isolates obtained from patients with vulvovaginal candidiasis. **Journal de Mycologie Médicale**, v.21, p.93-99, 2011.

KIRCHNER, K.; WISNIEWSKI JR, A.; CRUZ, A. B.; BIAVATTI, M. W.; NETZ, D. J. A. Chemical composition and antimicrobial activity of *Hidyosmum brasiliense* Miq.; Chloranthaceae, essential oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2010.

KOROCH, A.; RANARIVELO, L.; BEHRA, O.; JULIANI, H. R.; SIMON, J. E. Quality attributes of ginger and cinnamon essential oils from Madagascar. **Botanicals and Medicinals**, 2007.

LAMBERT, R. J.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P. J.; NYCHAS, G. J. E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, p.453-462, 2001.

LEITE, A. M.; LIMA E. O.; SOUZA, E. L.; DINIZ, M. F. F. M.; LEITE, S. P.; XAVIER, A. L.; MEDEIROS, I. A. Preliminary study of the molluscicidal and larvicidal properties of some essential oils and phytochemicals from medicinal plants. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.4, p.842-846, 2009.

LIMA, I. O.; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; FARIAS, N. M. P.; SOUZA, E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v.16, n.2, p.197-201, 2006.

LIN, M. Y.; CARMELI, Y.; ZUMSTEG, J.; FLORES, E. L.; TOLENTINO, J.; SREERAMOJU, P.; WEBER, S. G. Prior antimicrobial therapy and risk for hospital-acquired *Candida glabrata* e *Candida krusei* fungemia: a case-case-control study. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, n.11, p.4555-4560, 2005.

LOPEZ, J.; DALLE, F.R.; MANTELIN, P.; MAIROUX, P.; NIERLICH, A. C.; PACOT, A.; CUISENIER, B.; VAGNER, O.; BONNIN, A. Rapid identification of *Candida glabrata* based on trehalose and sucrose assimilation using rosco diagnostic tablets. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.3, p.1172-1174, 2001.

LORENZI, H; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512p.

MACÊDO, D. P. C.; SILVA, V. K. A.; FARIAS, A. M. A.; MELO, L. R. B.; WILHEIM, A. B.; NEVES, R. P. *Candida glabrata* esophagitis: new case reports and management. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.279-281, 2008.

MALANI, A.; HMOUD, J.; CHIU, L.; CARVER, P. L.; BIELACZYC, A.; KAUFFMAN, C. A. *Candida glabrata* fungemia: experience in a tertiary care center. **Clinical Infectious Diseases**, v.41, p.975-981, 2005.

MANGENA, T.; MUYIMA, N. Y. O. Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *Rosmarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains. **Letters in Applied Microbiology**, v.28, n.4, p.291-296, 1999.

MANOHAR, V.; INGRAM, C.; GRAY, J.; TALPUR, N. A.; ECHARD, B. W.; BAGCHI, D.; PREUSS, H. G. Antifungal activities of origanum oil against *Candida Albicans*. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.228, p.111-117, 2001.

MARCHETTI, O.; BILLE, J.; FLUCKIGER, U.; EGGIMANN, P.; RUEF, C.; GARBINO, J.; CALANDRA, T.; GLAUSER, M. P.; TAUBER, M. G.; PITTET, D. Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospital: secular trends, 1991-2000. **Clinical Infectious Diseases**, v.38, p.311-320, 2004.

MARTINS, C. A. P.; SANTOS, S. S. F.; LOBERTO, J. C. S.; ITO, C. Y. K.; JORGE, A. O. C. Presença *Candida* spp. em pacientes com periodontite crônica. **Ciência Odontológica Brasileira**, v.5; n.3; 2002.

MÍMICA, L. M. J.; UEDA, S. M. Y; MARTINO, M. D. V.; NAVARINI, A.; MARTINI, I. Diagnóstico de infecção por *Candida*: avaliação de testes de identificação de espécies e caracterização do perfil de suscetibilidade. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.45, n.1, p.17-23, 2009.

NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, P. O.; JÚNIOR, A. M. B.; TRINDADE, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p.108-113, 2007.

NETO, M. M.; COSTA, R. S.; REIS, M. A.; GARCIA, T. M. P.; FERRAZ, A. S.; SABER, L. T. S.; BATISTA, M. E. P. N.; MUGLIA, V.; FIGUEIREDO, J. F. C. Candidíase em pacientes transplantados renais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.30, n.6, p.485-491, 1997.

NOGUEIRA, J. C. R.; DINIZ, M. F. M.; LIMA, E. O. Atividade antimicrobiana in vitro de produtos vegetais em otite externa aguda. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v.74, n.1, p.118-124, 2008.

PAI M. P.; TURPIN, R. S.; GAREY, K. W. Association of fluconazole area under the concentration-time curve/MIC and dose/MIC ratios with mortality in nonneutropenic patients with candidemias. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.51, n.1, p.35-39, 2007.

PANACKAL, A. A.; GRIBSKOV, J. L.; STAAB, J. F.; KIRBY, K. A.; RINALDI, M.; MARR, K. A. Clinicial significance of azole antifungal drug cross-resistance in *Candida glabrata*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.5, p.1740-1743, 2006.

PAPPAS, P. G.; ROTSTEIN, C. M. F.; BETTS, R. F.; NUCCI, M.; TALWAR, D.; WAELE, J. J.; VAZQUEZ, J. A.; DUPONT, B. F.; HORN, D. L.; ZEICHNER, L. O.; REBOLI, A. C.; SUH B.; DIGUMARTI, R.; WU, C.; KOVANDA, L. L.; ARNOLD, L. J.; BUELL, D. N. Micafungin versus caspofungin for treatment of candidemia and other forms of invasive candidiasis. **Clinical Infectious Diseases**, v.45, p.883-893, 2007.

PEREIRA, R. S.; SUMITA, T. C.; FURLAN, M. R.; JORGE, A. O. C.; UENO, M. Antibacterial activity of essential oils on microorganisms isolated from urinary tract infection. **Revista de Saúde Pública**, v.38, n.2, p.326-328, 2004.

PFALLER, M. A. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. **Clinical Infectious Diseases**, v.22, p.889-894, 1996.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. **Clinical Microbiology and Infection**, v.10, p.11-23, 2004.

PFALLER, M. A.; MESSER, S. A.; HOLLIS, R. J.; BOYKEN, L.; TENDOLKAR, S.; KROEGER, J.; DIEDEMA, D. J. Variation in susceptibility of bloodstream isolates of *Candida glabrata* to fluconazole according to patient age and geographic location in the United States in 2001 to 2007. **Journal of Clinical Microbiology**, v.47, n.10, p.3185-3190, 2009.

PILAU, M. R.; ALVES, S. H.; WEIBLEN, R.; ARENHART, S.; CUETO, A. P.; LOVATO, L. T. Antiviral activity of the *Lippia graveolens* (Mexican oregano) essential oil and its main compound carvacrol against human and animal viruses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.42, p.1616-1624, 2011.

PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A. G.; PINTO, E.; OLIVEIRA, S. C.; TAVARES, C.; SALGUEIRO, L.; CAVALEIRO, C.; GONÇALVES, M. J.; OLIVEIRA, J. M. Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds. **European Academy of Dermatology and Venereology**, v.18, p.73-78, 2004.

POZZATTI, P.; SCHEID, L. A.; SPADER, T. B.; ATHAYDE, M. L.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H. *In vitro* activity of essential oils extracted from plants used as spices against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible *Candida* spp. **Canadian Journal Microbiology**, v.54, p.950-956, 2008.

RIBEIRO, E. L.; GUIMARÃES, R. I.; INÁCIO, M. C. C.; FERREIRA, W. M.; CARDOSO, C. G.; DIAS, S. M. S.; NAVES, P. L. F. Aspectos das leveduras de *Candida* vinculadas as infecções nosocomiais. **NewsLab**, edição 64, 2004.

CORREA-ROYERO, J.; TANGARIFE, V.; DURÁN, C.; STASHENKO, E.; MESA-ARANGO, A. *In vitro* antifungal activity and cytotoxic effect of essential oils and extracts of medicinal and aromatic plants against *Candida krusei* and *Aspergillus fumigatus*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.20, n.5, p.734-741, 2010.

SALGUEIRO, L. R.; CAVALEIRO, C.; GONÇALVES, M. J.; CUNHA, A. P. Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Lippia graveolens* from Guatemala. **Planta Medica**, v.69, n.1, p.80-83, 2003.

SANGEORZAN, J. A.; BRADLEY, S. F.; HE, X.; ZARINS, L. T.; RIDENOUR, G. L.; TIBALLI, R. N.; KAUFFMAN, C. A. Epidemiology of oral candidiasis in HIV-infected patients: colonization, infection, treatment, and emergence of fluconazole resistance. **The American Journal of Medicine**, v.97, p.339-346, 1994.

SANGLARD, D.; ISCHER, F.; CALABRESE, D.; MAJCHERCZYK, P.A.; BILLE, J. The ATP binding cassette transporter gene CgCDR1 from *Candida glabrata* is involved in the resistance of clinical isolates to azole antifungal agents. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.43, n.11, p.2753-2765, 1999.

SANTURIO, D. F.; COSTA, M. M.; MABONI, C. G.; CAVALHEIRO, C. P.; SÁ, M. F.; DAL POZZO, M.; ALVES, S. H.; FRIES, L. L. M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves e bovinos. **Ciência Rural**, v.41, n.6, p.1051-1056, 2011.

SCHNITZLER, P.; KOCH, C.; REICHLING, J. Susceptibility of drug-resistant clinical herpes simplex virus type 1 strains to essential oils of ginger, thyme, hyssop, and sandalwood. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.51, n.5, p.1859-1862, 2007.

SIDRIM, J. J. C. & ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

SIKKEMA, J.; BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, v.59, n.2, p.201-222, 1995.

SILVA, M. S. A.; SILVA, M. A.; HIGIO, J. S.; PEREIRA, M. S. V.; CARVALHO, A. A. T. Atividade antimicrobiana e antiaderente *in vitro* do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. sobre bactérias orais planctônicas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.2, p.236-240, 2008.

SIMÕES, C. M. O. (organizador) *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 1999.

SOLIMAN, K. M.; BADEAA, R. I. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. **Food and Chemical Toxicology**, v.40, n.11, p.1669-1675, 2002.

SOUZA, S. M. C.; PEREIRA, M. C.; ANGLÉLICO, C. L.; PIMENTA, C. J. Avaliação de óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento micelial de fungos associados a produtos de panificação. **Ciência e Agrotecnologia**, v.28, n.3, p.685-690, 2004.

SPELLBERG, B. J.; FILLER, S. G.; EDWARDS JR, J E. Current treatment strategies for disseminated candidiasis. **Clinical Infectious Diseases**, v.42, p.244-251, 2006.

TAMURA, N. K.; NEGRI, M. F. N.; BONASSOLI, L. A.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fatores de virulência de *Candida* spp isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.40, n.1, p.91-93, 2007.

TROMBETTA, D.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M. G.; VENUTI, V.; CRISTANI, M.; DANIELE, C.; SAIJA, A.; MAZZANTI, G.; BISIGNANO, G. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, n.6, p.2474-2478, 2005.

TSAI, H.F., KROL, A.A.; SARTI, K.E.; BENNETT, J.E. *Candida glabrata* PDR1, a transcriptional regulator of a pleiotropic drug resistance network, mediates azoles resistance in clinical isolates and petite mutants. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.50, n.4, p.1384-1392, 2006.

VAZQUEZ, J. A.; DEMBRY, L.; SANCHEZ, V.; VAZQUEZ, M. A.; SOBEL, J. D.; DMUCHOWSKI, C.; ZERVOS, M. J. Nosocomial *Candida glabrata* colonization na epidemiologic study. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.2, p.421-426, 1998.

VICTÓRIO, C. P.; ALVIANO, D. S.; ALVIANO, C. S.; LAGE, C. L. Chemical composition of the fractions of leaf oil of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B. L. Burtt & R.M. Sm. and antimicrobial activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.3, p.697-701, 2009.

WONG, M. C. C.; MORALES, C. R.; GUZMÁN, M. G. A.; CÁRDENAS, A. O.; GUERRA, C. A. A.; GONZÁLEZ, A. N.; GAXIOLA, J. A. S.; RÍOS, P. C. Antifungal properties of essential oil of mexican orégano (*Lippia berandieri*) against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. **Revista Mexicana de Micología**, v.31, p.29-35, 2010.

ZAGO, J. A. A.; USHIMARU, P. I.; BARBOSA, L. N.; JUNIOR, A. F. Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.4, p.828-833, 2009.

ZAOUTIS, T. E.; ARGON, J.; CHU, J.; BERLIN, J. A.; WALSH, T. J.; FEUDTNER, C. The epidemiology and attributable outcomes of candidemia in adults and children hospitalized in de United States: a propensity analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v.41, p.1232-1239, 2005.