

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

**SUSCETIBILIDADE DE *Candida* spp SENSÍVEIS E
RESISTENTES AO FLUCONAZOL FRENTE A ÓLEOS
ESSENCIAIS EXTRAÍDOS DE CONDIMENTOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Patrícia Pozzatti

**Santa Maria, RS, Brasil
2007**

SUSCETIBILIDADE DE *Candida* spp RESISTENTES E SENSÍVEIS AO FLUCONAZOL FRENTE A ÓLEOS ESSENCIAIS EXTRAÍDOS DE CONDIMENTOS

por

Patrícia Pozzatti

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

Orientador: Prof. Sydney Hartz Alves

Santa Maria, RS, Brasil

2007

**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

**SUSCETIBILIDADE DE *Candida* spp RESISTENTES E SENSÍVEIS
AO FLUCONAZOL FRENTE A ÓLEOS ESSENCIAIS EXTRAÍDOS DE
CONDIMENTOS**

elaborada por
Patrícia Pozzatti

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

Sydney Hartz Alves, Dr.
(Presidente/Orientador)

Berta Maria Heinzmann, Dra. (UFSM)

Laerte Ferreira, Dr. (UFRGS)

Santa Maria, 23 de março de 2007.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,

**Laudi Valentim Pozzatti e
Célia Maria Rossatto Pozzatti**

por seu amor, dedicação e apoio,

compartilho esta conquista com vocês.

“Talvez meio caminho andado seja a gente acreditar no que faz. Mas acima de tudo, o que mais nos incentiva, que mais nos valoriza e também mais nos torna conscientes de nossa responsabilidade, é saber que os outros crêem em nós. E não há palavras que descrevam o que sentimos ao saber dos sacrifícios a que eles se impõem por crerem não apenas em nós, mas também no que cremos.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A Deus por permitir que eu chegasse até aqui, me proporcionando saúde, e principalmente, à iluminação do Espírito Santo, que sempre me acompanhou durante a pesquisa, me guiando pelo caminho mais correto.

Aos meus amados pais, pelo apoio tanto emocional quanto financeiro e por estarem sempre me impulsionando a seguir a vida acadêmica, sem nunca ousar pensar em desistir deste ideal. Serei eternamente grata a vocês.

Aos meus irmãos, Daniel e Juliana, pela força e presença contínua em minha vida, e ao meu sobrinho Dante Valentino, que entrou na hora certa em nossa família, me trazendo alegria, luz, amor, inspiração e os sentimentos mais puros e sinceros que podem ser expressos por um anjo... obrigada pelo seu sorriso, ele me fortaleceu muitas vezes.

Ao Luiz Carlos, por todo seu amor, carinho, paciência, compreensão e apoio, estando sempre ao meu lado, superando todos os obstáculos que apareceram no nosso caminho. Tu sabes que esta conquista também é tua, meu amor.

Ao meu orientador, Professor Doutor Sydney Hartz Alves, que sempre foi um modelo de pesquisador e, acima de tudo, um ser humano com qualidades invejáveis: obrigada por todos os teus ensinamentos, por tua disponibilidade, paciência, amizade, compreensão, confiança... Nunca esquecerei da frase de Louis Pasteur que citaste para mim: "*A sorte favorece os espíritos bem preparados.*", pois neste dia, realmente entendi o sentido de eu estar ali pesquisando, aprendendo, errando e acertando diariamente.

Aos "amigos do LAPEMI", Everton, Paulo Guilherme, Érico, Tatiana, Elenize, Débora, Ayrton, Juliana, Izabel, Stela, Daniela, Deise, João, Fernando, Flávio, Ricardo, Régis, enfim a todos que passaram pelo laboratório durante os dois anos em que lá permaneci. Queridos colegas, obrigada por estarem sempre ao meu lado

tanto nas horas de trabalho quanto nas horas de diversão... amigos, nunca esquecerei de vocês. Em especial, gostaria de agradecer a minha “colega número um”, não só do LAPEMI, mas para todo sempre, Liliane: por todos os infindáveis dias que passamos juntas trabalhando, trocando experiências profissionais, histórias pessoais, “fofocas”... enfim por toda amizade, carinho, coleguismo que tu sempre demonstraste para comigo, me auxiliando, incentivando e ensinando muitas coisas boas... conta comigo sempre, amiga!

Ao Professor Jânio M. Santurio, pela sua amizade e por todo suporte laboratorial e recursos disponibilizados para o desenvolvimento da minha pesquisa.

Aos meus colegas de mestrado e amigos que estiveram ao meu lado na luta para obter o título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

A Sandra, técnica do laboratório, por toda sua ajuda e amizade prestada durante os dois anos de pesquisa.

À professora Simone Gonçalves Cardoso, em nome de todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

À professora Berta M. Heinzmann, por estar sempre disposta a esclarecer meus questionamentos.

A Elaide, secretária do curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, por sempre me receber com um sorriso amigo no rosto, me ajudando a resolver todos os problemas burocráticos que envolvem um curso de mestrado.

Aos professores: Doutor Ademir Morel e Doutor Nilo Zanatta, pelo auxílio na realização de uma etapa indispensável para a minha pesquisa.

Enfim, obrigada a todos, mesmo àqueles que não tenham sido citados, mas que de alguma forma colaboraram para o desenvolvimento da minha pesquisa e que acreditaram e torceram pela minha vitória.

*“É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver...”*

Martin Luther King

RESUMO

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

SUSCETIBILIDADE DE *Candida* spp. RESISTENTES E SENSÍVEIS AO FLUCONAZOL FRENTE A ÓLEOS ESSENCIAIS EXTRAÍDOS DE CONDIMENTOS

Autora: Patrícia Pozzatti

Orientador: Sydney Hartz Alves

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 23 de março de 2007.

No presente estudo avaliou-se a atividade antifúngica de diferentes óleos essenciais obtidos de plantas tradicionalmente utilizadas como condimentos, frente a isolados de *Candida* comprovadamente sensíveis e resistentes ao fluconazol. Para tanto, determinou-se a concentração inibitória mínima parcial e total, CIM_P e CIM_T, respectivamente, bem como a concentração fungicida mínima (CFM) frente as diferentes espécies de *Candida*. Também foi avaliada a concentração mínima de óleo capaz de inibir a formação de tubos germinativos (CIMTG) em *C. albicans* e *C. dubliniensis* sensíveis e resistentes ao fluconazol. As espécies de *Candida* utilizadas na pesquisa incluíram: *Candida albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*. Os óleos essenciais testados foram obtidos de: *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (canela), *Lippia graveolens* HBK (orégano mexicano), *Ocimum basilicum* L. (manjeriço), *Origanum vulgare* L. (orégano), *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim), *Salvia officinalis* L. (sálvia), *Thymus vulgaris* L. (tomilho) e *Zingiber* sp. (gengibre). A metodologia empregada foi a microdiluição em caldo, de acordo com o documento M27-A2 do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2002). Para avaliar a inibição da formação de tubos germinativos pelos óleos essenciais, utilizou-se o meio sintético Fase M. A composição química dos óleos essenciais foi obtida através de cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (CG-EM) e através do cálculo do índice de retenção (IR). Os resultados encontrados para os testes de atividade antifúngica foram analisados através do teste estatístico de Mann Whitney. Diante disto, observou-se que os óleos essenciais de manjeriço, alecrim e sálvia não evidenciaram atividade antifúngica frente aos isolados de *Candida* nas concentrações testadas. Entretanto, os óleos essenciais de canela, orégano mexicano, orégano, tomilho e gengibre demonstraram diferentes níveis de atividade antifúngica, sendo o óleo de orégano o mais potente, e o de gengibre, o de menor atividade. Em adição ao amplo espectro de atividade antifúngica dos óleos essenciais citados, observou-se que concentrações semelhantes de óleo essencial foram capazes de inibir o crescimento fúngico ou de serem fungicidas para isolados originalmente sensíveis e resistentes ao fluconazol. Além disso, alguns dos óleos também demonstraram moderada atividade contra espécies de *Candida* que naturalmente apresentam elevadas CIMs ao fluconazol, tais como *C. glabrata* e *C. krusei*. Todos os óleos essenciais inibiram a formação de tubos germinativos, havendo destaque para o de orégano, e menor inibição pelo óleo de alecrim. Os constituintes majoritários presentes nos óleos essenciais foram: Z-iso Eugenol (93,3%) para a canela; carvacrol (56,8%) e o-cimeno (32,2%) para orégano mexicano; linalol (32,22%) e 1,8-cineol (23,61%) para o manjeriço; carvacrol (92,6%) para o orégano; 1,8-cineol (28,59%) e cânfora (26,31%) para o alecrim; cis-tujona (40,61%) para a sálvia; γ -terpineno (64%) para o tomilho; e zingibereno (20,81%) para o óleo essencial de gengibre. Em conclusão, os resultados permitiram constatar que *Candida* spp resistentes ao fluconazol, respeitadas algumas particularidades, foram sensíveis aos óleos essenciais que evidenciaram atividade antifúngica.

Palavras-chave: candidíases; *Candida* spp; resistência ao fluconazol; óleos essenciais.

ABSTRACT

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

SUSCETIBILITY FROM FLUCONAZOLE RESISTANTS AND SENSIBLES *Candida* spp AGAINST ESSENTIAL OILS EXTRACTED FROM CONDIMENTS

Autora: Patrícia Pozzatti

Orientador: Sydney Hartz Alves

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 23 de março de 2007.

In the present study, it was assessed antifungal activity of different essential oils obtained from plants traditionally used as condiments, against *Candida* isolates proven to be susceptible and resistant to the antifungal agent fluconazole. In this context, partial and total minimal concentration values, MIC_P e MIC_T, respectively, as well as minimal fungicidal concentration (MFC) of essential oils against different species of *Candida* were determined. In addition, it was evaluated minimal concentrations of oils that could inhibit germ tube formation by fluconazole susceptible and resistant isolates of *C. albicans* and *C. dubliniensis*. *Candida* species used in this study were: *Candida albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* and *C. krusei*. The essential oils were obtained from: *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (cinnamon), *Lippia graveolens* HBK (Mexican oregano), *Ocimum basilicum* L. (basil), *Origanum vulgare* L. (oregano), *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary), *Salvia officinalis* L. (sage), *Thymus vulgaris* L. (thyme) and *Zingiber* sp. (ginger). The methodology used was broth microdilution, according to M27-A2 document provided by National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2002). In order to assess inhibition of germ tube formation by essential oils, it was used the synthetic medium Phase M. Chemical composition of essential oils was obtained through gas chromatography-mass spectroscopy (GC-MS) and through calculation of retention index (RI). Results of antifungal activity tests were analyzed through Mann Whitney statistic test. Subsequently, it was noticed that basil, rosemary and sage essential oils did not show antifungal activity against *Candida* isolates on tested concentrations. However, cinnamon, Mexican oregano, oregano, thyme and ginger essential oils showed different levels of antifungal activity, being oregano oil the most potent and ginger oil the least efficient. Considering the extended spectrum of antifungal activity presented by these essential oils, it was noticed that similar concentrations could inhibit fungal growth or be fungicidal to isolates originally sensible and resistant to fluconazole. Besides, some oils also demonstrated moderate activity against *Candida* species which naturally show high fluconazole MICs, such as *C. glabrata* e *C. krusei*. All the essential oils inhibited germ tube formation, being oregano oil the most active and rosemary oil the least one. The majoritary constituents in the essential oils were: Z-isoeugenol (93,3%) for cinnamon; carvacrol (56,8%) and o-cymene (32,2%) for Mexican oregano; linalool (32,22%) and 1,8-cineole (23,61%) for basil; carvacrol (92,6%) for oregano; 1,8-cineole (28,59%) and camphor (26,31%) for rosemary; cis-thujone (40,61%) for sage; γ -terpinene (64%) for thyme; and zingiberene (20,81%) for ginger essential oil. In conclusion, these results made possible evidencing that *Candida* spp isolates which are resistant to fluconazole, except for some particularities, were sensible to essential oils that demonstrated antifungal activity.

Keywords: candidiasis, *Candida* spp, fluconazole resistance, essential oils.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Suscetibilidade <i>in vitro</i> de <i>Candida albicans</i> e espécies de <i>Candida</i> não- <i>albicans</i> frente ao óleo essencial de <i>Cinnamomum zeylanicum</i>	62
TABELA 1.1 - Valores de p e sua significância nas comparações entre a suscetibilidade (CIM _P , CIM _T , CFM) de espécies de <i>Candida</i> sensíveis e resistentes ao fluconazol, frente ao óleo essencial de <i>C. zeylanicum</i>	63
TABELA 2 - Suscetibilidade <i>in vitro</i> de <i>Candida albicans</i> e espécies de <i>Candida</i> não- <i>albicans</i> frente ao óleo essencial de <i>Lippia graveolens</i>	65
TABELA 2.1 - Valores de p e sua significância nas comparações entre a suscetibilidade (CIM _P , CIM _T , CFM) de espécies de <i>Candida</i> sensíveis e resistentes ao fluconazol, frente ao óleo essencial de <i>L. graveolens</i>	66
TABELA 3 - Suscetibilidade <i>in vitro</i> de <i>Candida albicans</i> e espécies de <i>Candida</i> não- <i>albicans</i> frente ao óleo essencial de <i>Ocimum basilicum</i>	67
TABELA 4 - Suscetibilidade <i>in vitro</i> de <i>Candida albicans</i> e espécies de <i>Candida</i> não- <i>albicans</i> frente ao óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i>	69
TABELA 4.1 - Valores de p e sua significância nas comparações entre a suscetibilidade (CIM _P , CIM _T , CFM) de espécies de <i>Candida</i> sensíveis e resistentes ao fluconazol, frente ao óleo essencial de <i>O. vulgare</i>	70
TABELA 5 - Suscetibilidade <i>in vitro</i> de <i>Candida albicans</i> e espécies de <i>Candida</i> não- <i>albicans</i> frente ao óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i>	71
TABELA 6 - Suscetibilidade <i>in vitro</i> de <i>Candida albicans</i> e espécies de <i>Candida</i> não- <i>albicans</i> frente ao óleo essencial de <i>Salvia officinalis</i>	73
TABELA 7 - Suscetibilidade <i>in vitro</i> de <i>Candida albicans</i> e espécies de <i>Candida</i> não- <i>albicans</i> frente ao óleo essencial de <i>Thymus vulgaris</i>	75

TABELA 7.1 - Valores de p e sua significância nas comparações entre a suscetibilidade (CIM _P , CIM _T , CFM) de espécies de <i>Candida</i> sensíveis e resistentes ao fluconazol, frente ao óleo essencial de <i>T. vulgaris</i>	76
TABELA 8 - Suscetibilidade <i>in vitro</i> de <i>Candida albicans</i> e espécies de <i>Candida</i> não- <i>albicans</i> frente ao óleo essencial de <i>Zingiber</i> sp.....	78
TABELA 8.1 - Valores de p e sua significância nas comparações entre a suscetibilidade (CIM _P , CIM _T , CFM) de espécies de <i>Candida</i> sensíveis e resistentes ao fluconazol, frente ao óleo essencial de <i>Zingiber</i> sp.....	79
TABELA 9 - Análise dos valores de CIM ₅₀ e CIM ₉₀ dos óleos essenciais extraídos de condimentos, frente aos isolados de <i>Candida</i> sensíveis e resistentes ao fluconazol	81
TABELA 10 - Concentração inibitória mínima de óleo essencial para inibição dos tubos germinativos de <i>C. albicans</i> e <i>C. dubliniensis</i> sensíveis e resistentes ao fluconazol	83
TABELA 10.1 - Valores de p obtidos nas comparações entre as CIMs de óleos essenciais requeridas para inibição de tubos germinativos de <i>C. albicans</i> e <i>C. dubliniensis</i> , sensíveis e resistentes ao fluconazol	83
TABELA 11 - Composição química dos óleos essenciais	85

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

QUADRO 1 – Distribuição das espécies de <i>Candida</i> de acordo com a suscetibilidade ao fluconazol.....	48
QUADRO 2 – Relação das espécies vegetais das quais foram obtidos os óleos essenciais estudados.....	49
FIGURA 1 – Visualização da CIM do óleo essencial de orégano frente <i>Candida</i> spp através da técnica de microdiluição em caldo.....	55
FIGURA 2 – Visualização da CIM do óleo essencial de alecrim frente <i>Candida</i> spp através da técnica de microdiluição em caldo.....	55
QUADRO 3 – Microrganismos pesquisados.....	56
FIGURA 3 – Aspectos microscópicos de <i>Candida albicans</i> em meio Fase M....	58

LISTA DE REDUÇÕES

%	Por cento	cm	Centímetro
>	Maior do que	g	gramas
≤	Maior do que ou igual a	HIV	human immunodeficiency virus
<	Menor do que	ISO	International Organization Standard
≥	Menor do que ou igual a	IR	Índice de retenção
°C	Graus Celcius	kg	kilograma
μg	Micrograma	M	Molar
μL	Microlitro	mg	Miligrama
=	Igual a	mL	Mililitro
AIDS	“Acquired Immunodeficiency Syndrome”	mm	Milímetro
ATCC	American Type Culture Collection	mM	Milimolar
CFM	Concentração fungicida mínima	n	Número
CG	Cromatografia gasosa	NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas	nm	Nanômetro
CIM _P	Concentração inibitória mínima parcial	q.s.p.	Quantidade suficiente para
CIM _T	Concentração inibitória mínima total	spp	Espécies
CIMTG	Concentração inibitória mínima de tubo germinativo	x	vezes ou versus

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 –	Preparação dos meios de cultura utilizados no estudo.....	126
Anexo 2 –	Cromatogramas dos óleos essenciais e espectros de massas de seus constituintes majoritários	127

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1	Candidíases	20
3.2	Tubos germinativos: importância na identificação e como fator de virulência	23
3.3	Antifúngicos azólicos	23
3.4	A emergência da resistência em fungos	24
3.5	Mecanismos da resistência de <i>Candida</i> spp aos antifúngicos azólicos	26
3.6	Resistência cruzada	28
3.7	Técnicas de avaliação da resistência	29
3.8	Óleos essenciais	30
3.9	Plantas com ação antimicrobiana	30
3.10	Mecanismos de ação antimicrobiana dos óleos essenciais	35
3.10.1	Toxicidade dos óleos essenciais	37
3.11	Condimentos e seus óleos essenciais	38
3.11.1	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	38
3.11.2	<i>Lippia graveolens</i>	39
3.11.3	<i>Ocimum basilicum</i>	40
3.11.4	<i>Origanum vulgare</i>	40
3.11.5	<i>Rosmarinus officinalis</i>	42
3.11.6	<i>Salvia officinalis</i>	43
3.11.7	<i>Thymus vulgaris</i>	44

3.11.8	<i>Zingiber sp</i>	45
3.12	Ação de óleos essenciais sobre a formação de tubo germinativo	47
4	MATERIAIS E METODOLOGIA	48
4.1	Microrganismos	48
4.2	Óleos essenciais	49
4.2.1	Obtenção dos óleos essenciais	50
4.2.2	Análise dos constituintes químicos dos óleos essenciais	50
4.3	Avaliação da atividade de óleos essenciais frente a <i>Candida spp</i>.....	52
4.3.1	Técnica utilizada	52
4.3.2	Diluição dos óleos essenciais	52
4.3.3	Preparação dos inóculos	53
4.3.4	Inoculação nas placas de microtitulação	53
4.3.5	Incubação	54
4.3.6	Leitura dos testes	54
4.3.7	Concentração fungicida mínima (CFM)	56
4.4	Inibição da emissão de tubo germinativo como prova de atividade antifúngica	56
4.4.1	Técnica de determinação da concentração inibitória mínima para tubos germinativos (CIMTG)	57
4.5	Análise Estatística	58
5	RESULTADOS	60
5.1	Perfil de suscetibilidade de leveduras patogênicas frente a óleos essenciais extraídos de condimentos	60
5.1.1	Suscetibilidade de <i>Candida spp</i> , sensíveis e resistentes ao fluconazol, frente ao óleo essencial de <i>Cinnamomum zeylanicum</i>	60
5.1.2	Suscetibilidade de <i>Candida spp</i> , sensíveis e resistentes ao fluconazol, frente ao óleo essencial de <i>Lippia graveolens</i>	63
5.1.3	Suscetibilidade de <i>Candida spp</i> , sensíveis e resistentes ao fluconazol, frente ao óleo essencial de <i>Ocimum basilicum</i>	66
5.1.4	Suscetibilidade de <i>Candida spp</i> , sensíveis e resistentes ao fluconazol, frente ao óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i>	68
5.1.5	Suscetibilidade de <i>Candida spp</i> , sensíveis e resistentes ao fluconazol, frente ao óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i>	70

5.1.6	Suscetibilidade de <i>Candida</i> spp, sensíveis e resistentes ao fluconazol, frente ao óleo essencial de <i>Salvia officinalis</i>	72
5.1.7	Suscetibilidade de <i>Candida</i> spp, sensíveis e resistentes ao fluconazol, frente ao óleo essencial de <i>Thymus vulgaris</i>	74
5.1.8	Suscetibilidade de <i>Candida</i> spp, sensíveis e resistentes ao fluconazol, frente ao óleo essencial de <i>Zingiber</i> sp.	76
5.2	Valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ dos óleos essenciais extraídos de condimentos frente a espécies de <i>Candida</i> sensíveis e resistentes ao fluconazol	80
5.3	Suscetibilidade de <i>C. albicans</i> e <i>C. dubliniensis</i>, sensíveis e resistentes ao fluconazol, frente a óleos essenciais extraídos de condimentos, com base na inibição de tubos germinativos	81
5.4	Composição química dos óleos essenciais	84
6	DISCUSSÃO	86
6.1	Perfil de suscetibilidade de <i>Candida</i> spp frente a óleos essenciais extraídos de condimentos	86
6.1.1	Perfil de suscetibilidade de <i>Candida</i> spp aos óleos essenciais de <i>Rosmarinus officinalis</i> (alecrim), <i>Ocimum basilicum</i> (manjerição) e <i>Salvia officinalis</i> (sálvia)	89
6.1.2	Perfil de suscetibilidade de <i>Candida</i> spp ao óleo essencial de <i>Cinnamomum zeylanicum</i> (canela)	91
6.1.3	Perfil de suscetibilidade de <i>Candida</i> spp ao óleo essencial de <i>Lippia graveolens</i> (orégano mexicano)	93
6.1.4	Perfil de suscetibilidade de <i>Candida</i> spp ao óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> (orégano)	94
6.1.5	Perfil de suscetibilidade de <i>Candida</i> spp ao óleo essencial de <i>Thymus vulgaris</i> (tomilho)	95
6.1.6	Perfil de suscetibilidade de <i>Candida</i> spp ao óleo essencial de <i>Zingiber</i> sp. (gingibre)	97
6.2	Suscetibilidade de <i>C. albicans</i> e <i>C. dubliniensis</i>, sensíveis e resistentes ao fluconazol, frente a óleos essenciais extraídos de condimentos, com base na inibição de tubos germinativos	99

6.3	Considerações finais	101
7	CONCLUSÕES	104
7.1	Atividade fungistática de óleos essenciais extraídos de condimentos frente a leveduras do gênero <i>Candida</i> , sensíveis e resistentes ao fluconazol, através da determinação da CIM _P e CIM _T ..	104
7.2	Concentração fungicida mínima (CFM) dos óleos essenciais extraídos de condimentos frente a leveduras do gênero <i>Candida</i> sensíveis e resistentes ao fluconazol	105
7.3	Comparação entre a suscetibilidade de <i>C. dubliniensis</i> e <i>C. albicans</i> , sensíveis e resistentes ao fluconazol, frente aos óleos essenciais em estudo	105
7.4	Comparação dos perfis de suscetibilidade de <i>C. albicans</i> e não- <i>albicans</i> frente aos óleos essenciais em estudo	105
7.5	Determinação da menor concentração de óleo essencial capaz de inibir a emissão de tubo germinativo (CIMTG) em <i>C. albicans</i> e <i>C. dubliniensis</i> sensíveis e resistentes ao fluconazol	106
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
9	ANEXOS	126

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, limitado número de agentes antifúngicos está disponível para o tratamento de infecções por espécies de *Candida*. Os principais agentes são os poliênicos anfotericina B e nistatina e os azólicos, como cetoconazol, fluconazol, itraconazol, posaconazol, ravuconazol e voriconazol, entre outros (SIDRIM & MOREIRA, 1999). Recentes estudos têm evidenciado diferentes espécies de *Candida* resistentes aos azóis (PFALLER et al, 1999b; SOBEL et al, 2000; PEREA et al, 2001; MARR et al, 2001; SANGLARD & ODDS, 2002), bem como forte toxicidade ligada ao uso dos poliênicos, particularmente anfotericina B (ELLIS, 2002; BAGINSKI et al, 2005). Neste contexto, faz-se necessário o desenvolvimento de pesquisas sobre novos agentes antifúngicos que sejam eficazes e seguros para o tratamento ou profilaxia de candidíases.

As candidíases orofaríngeas acometem 80 a 95% dos pacientes com AIDS (GREENSPAN, 1994; VAN METER et al, 1994). As espécies de *Candida* mais comumente envolvidas em quadros clínicos são: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*. Outras, menos freqüentemente isoladas, incluem *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae*, *C. rugosa*, *C. pseudotropicalis* e *C. guilliermondii* (SIDRIM & MOREIRA, 1999). Os antifúngicos azólicos de uso oral, tais como cetoconazol, fluconazol e itraconazol são comumente empregados em terapias supressivas ou profiláticas de quadros de candidíase orofaríngea e esofágica em pacientes com AIDS. Como conseqüência, a incidência de casos refratários de candidíase orofaríngea, decorrentes da emergente resistência de *Candida* aos azóis, vem crescendo e se tornando comum durante a terapia de pacientes em estágio avançado da doença (BOKEN et al, 1993; WHITE & GOETZ, 1994).

A fitoterapia tem sido alvo de diversas investigações científicas relacionando usos, efeitos e propriedades farmacológicas das plantas medicinais. As plantas, em geral, têm ampla habilidade de sintetizar substâncias odoríferas, das quais a maioria são terpenos ou seus derivados oxigenados. Geralmente, estes compostos são metabólitos secundários que servem como mecanismo de defesa para a planta contra ataques por microrganismos e herbívoros, além de atraírem insetos visando à polinização. Muitos constituintes vegetais originam o seu aroma, e algumas ervas, historicamente utilizadas como condimentos, podem também ser empregadas na

área farmacológica (COWAN, 1999). Os óleos essenciais vêm sendo usados com diversas finalidades durante muitos séculos; nas últimas décadas, numerosos estudos *in vitro* e *in vivo* foram realizados avaliando as atividades antibacterianas e antifúngicas destas substâncias (COSENTINO et al, 1999; PINA-VAZ et al, 2004; TAMPIERI et al, 2005).

Óleos essenciais, conforme a ISO 9235:1997 (International Standard Organization), são produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste com vapor d'água, ou os produtos obtidos pelo processamento mecânico dos pericarpos de frutos cítricos (Rutaceae). De modo geral, podem ser conceituados como misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente líquidas e odoríferas (ISO 9235, 1997; SIMÕES et al, 1999). Em sua grande maioria, os óleos essenciais consistem de misturas de hidrocarbonetos (monoterpenos, sesquiterpenos, entre outros) e compostos oxigenados (álcoois, ésteres, éteres, aldeídos, cetonas, lactonas, fenóis, éteres fenólicos, etc.). Quimicamente, estes constituintes pertencem à classe dos terpenóides, originados a partir do ácido mevalônico, ou dos fenilpropanóides, provindos do ácido chiquímico (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).

As propriedades antimicóticas de óleos essenciais derivados de condimentos, popularmente utilizados na culinária, não se constituem em propostas inovadoras no âmbito científico. Todavia, perfis de suscetibilidade de isolados clínicos de diferentes espécies de *Candida* resistentes ao antifúngico fluconazol, frente a óleos essenciais, não foram consistentemente estudados até o presente momento. Também, as metodologias empregadas na maioria dos estudos já publicados envolvendo atividade antifúngica de óleos essenciais não utilizaram técnicas padronizadas, visto que estas estiveram disponíveis somente a partir de 2002 (NCCLS, 2002). Neste contexto, faz-se necessário ampliar os conhecimentos sobre a interação entre óleos essenciais e fungos patogênicos de difícil tratamento. O uso popularizado de condimentos torna os óleos essenciais um potente arsenal para novas propostas terapêuticas, as quais merecem ser avaliadas.

Diante destas considerações, o presente projeto objetivou, de forma geral, verificar a atividade antifúngica de óleos essenciais extraídos de algumas plantas utilizadas como condimentos, frente a espécies do gênero *Candida* comprovadamente sensíveis e resistentes ao fluconazol.

2 OBJETIVOS

- 2.1 Verificar a atividade fungistática dos óleos essenciais extraídos de condimentos frente a leveduras do gênero *Candida*, comprovadamente sensíveis e resistentes ao fluconazol, através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) parcial e total, CIM_P e CIM_T, respectivamente.
- 2.2 Determinar a concentração fungicida mínima (CFM) dos óleos essenciais extraídos de condimentos frente a leveduras do gênero *Candida*, comprovadamente sensíveis e resistentes ao fluconazol.
- 2.3 Caracterizar a suscetibilidade de *C. dubliniensis*, sensíveis e resistentes ao fluconazol, frente aos óleos essenciais em estudo, comparando-a com a de *C. albicans*.
- 2.4 Comparar os perfis de suscetibilidade de *C. albicans* e não-*albicans* frente aos óleos essenciais em estudo.
- 2.5 Determinar a menor concentração de óleo essencial capaz de inibir a emissão de tubo germinativo (CIMTG) em *C. albicans* e *C. dubliniensis* sensíveis e resistentes ao fluconazol.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Candidíases

O espectro das candidíases é bastante extenso, podendo variar desde manifestações banais como a colonização de mucosas, até quadros sistêmicos com a invasão de diversos órgãos. As mucosas oral, vaginal e esofágica são as mais freqüentemente envolvidas em quadros de candidíase. Durante muito tempo, acreditou-se que apenas *C. albicans* era capaz de causar doenças humanas; hoje, entretanto, sabe-se que a maioria das leveduras pode levar a diversos tipos de quadros clínicos dependendo das condições imunológicas do hospedeiro (SIDRIM & MOREIRA, 1999). As espécies comumente implicadas são: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei*; espécies menos freqüentes são *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae*, *C. rugosa*, *C. pseudotropicalis*, *C. guilliermondii*, entre outras leveduras (CANDIDO et al, 1995; SIDRIM & MOREIRA, 1999).

A candidíase é a infecção fúngica oportunista mais comum, destacando-se a orofaríngea em pacientes com AIDS. Cerca de 90% destes apresentam a infecção pelo menos uma vez durante o curso da doença (SAMARANAYAKE, 1992; KORTING et al, 1999).

Na microbiota fúngica da cavidade oral, há predomínio do gênero *Candida* entre outras leveduras (PARK & YAACOB, 1994; CANDIDO et al, 1995). Existem evidências de que a colonização deste local por leveduras em indivíduos normais é muito variável; na literatura, têm sido relatados índices de 5 a 60%, com média em torno de 40% (MEUNIER, 1989; SAMARANAYAKE, 1992; CHALLACOMBE, 1994; LYNCH, 1994; CANDIDO et al, 1995; MILAN et al, 2001).

O número de indivíduos com AIDS vem aumentando muito nos últimos anos, e há vários relatos indicando a presença de lesões recorrentes por *Candida* spp principalmente na mucosa oral desses pacientes (SANGEORZAN et al, 1994; REX et al, 1995; REVANKAR et al, 1996; VAZQUEZ, 2000; WALSH et al, 2000). Neste contexto, a pesquisa de novas propostas terapêuticas contra candidíase orofaríngea torna-se um importante alvo.

As variantes clínicas da candidíase orofaríngea que normalmente acometem pacientes infectados pelo HIV são a pseudomembranosa, eritematosa, hiperplásica e a queilite angular (SAMARANAYAKE, 1992; KOLOKOTRONIS et al, 1994; REEF & MAYER, 1995; SILVERMAN et al, 1996). A forma pseudomembranosa pode ocorrer em qualquer área da mucosa oral, porém é mais freqüente na língua, palato mole e duro; as lesões aparecem como placas esbranquiçadas aderidas à mucosa, e são caracterizadas por um fundo eritematoso que pode ser visto quando as placas são removidas (ODDS, 1988; KOLOKOTRONIS et al, 1994; SILVERMAN et al, 1996). Na candidíase eritematosa, são observadas áreas avermelhadas, em geral, localizadas no palato e dorso da língua (KOSTIALA et al, 1979). A forma hiperplásica caracteriza-se por lesões amareladas que não podem ser removidas; nos indivíduos HIV positivos, este tipo de lesão normalmente ocorre bilateralmente na cavidade oral, nas bordas laterais da língua e no palato. Na variante queilite angular, observa-se a ocorrência de eritema e fissuras, com ou sem ulcerações, nas comissuras labiais (SAMARANAYAKE & HOLMSTRUP, 1989; SAMARANAYAKE, 1992).

A espécie do gênero *Candida* mais isolada da cavidade oral de pacientes com AIDS, com e sem lesões orais, é a *C. albicans* (63-93%), seguida por *C. glabrata* (14-21%), *C. krusei* (4-10%), *C. tropicalis* (2-7%) e outras. Pacientes com imunossupressão severa apresentam elevadas taxas de colonização e alta freqüência de espécies não-*albicans* (FETTER et al, 1993). No Brasil, Milan et al (1998) observaram que 22% dos pacientes infectados ou colonizados por *Candida* spp apresentavam espécies não-*albicans* na cavidade oral, com predominância de *C. glabrata* e *C. krusei*.

A expressão da virulência de *C. albicans* na cavidade oral está correlacionada com o sistema imune do hospedeiro (LOPEZ-RIBOT et al, 1999). Além disso, outras condições, como hipossalivação, diabetes mellitus e tratamento prolongado com antibacterianos ou corticosteróides, também predis põem a candidíase de orofaringe (KNIGHT & FLETCHER, 1971). Características específicas de *C. albicans* que contribuem para o desenvolvimento da referida doença incluem, entre outras, sua habilidade de aderir e colonizar a mucosa oral (KENNEDY, 1988) e de formar tubo germinativo (CASANOVA et al, 1997).

Embora *C. albicans* seja a levedura patogênica humana mais comum, outras espécies de *Candida*, assim como *C. krusei* e *C. glabrata*, vêm sendo reconhecidas como agentes emergentes especialmente em pacientes imunodeprimidos. Estas

espécies são intrinsecamente resistentes ao fluconazol, triazólico utilizado mundialmente (SOBEL, 1998; REICHART et al, 2002). Em contraste com *C. krusei* e *C. glabrata*, *C. tropicalis* é, de modo geral, suscetível ao fluconazol (PFALLER et al, 2000).

Em 1995, Sullivan et al avaliaram isolados de *Candida* com características não usuais, provenientes de pacientes infectados com o HIV e que mantinham histórico de candidíase orofaríngea recorrente. Estes isolados eram produtores de clamidoconídios, assim como *C. albicans*, porém não podiam ser identificados como tal em decorrência de diferenças significativas no perfil bioquímico e, particularmente, no padrão genotípico. Tais isolados apontaram para uma nova espécie, a qual foi denominada de *Candida dubliniensis* (SULLIVAN et al, 1995). Esta espécie é o mais novo fungo patogênico reconhecido como agente de candidíase oral em pacientes com AIDS. Embora estudos preliminares indiquem que a maioria dos isolados de *C. dubliniensis* é suscetível aos agentes antifúngicos disponíveis, cepas resistentes ao fluconazol têm sido detectadas (PFALLER et al, 1999a).

Recentes publicações têm descrito casos de candidíase superficial e sistêmica por *C. dubliniensis* em pacientes HIV positivos e negativos em vários países (SULLIVAN et al, 1997; ODDS et al, 1998; BRANDT et al, 2000; JABRA-RIZK et al, 2000). Entretanto, ainda há poucos dados disponíveis sobre a incidência dessa espécie na América do Sul (RODERO et al, 1998; ALVES et al, 2001).

Acredita-se que os fatores de virulência sejam semelhantes para *C. dubliniensis* e *C. albicans*, no entanto, poucos autores discorrem a respeito deste assunto. *C. dubliniensis* produz maior atividade de proteinase que *C. albicans*, sendo mais aderente que esta às células epiteliais bucais, na presença de glicose. Por outro lado, a produção de hifas é mais lenta em *C. dubliniensis*, sugerindo que esta espécie tenha menor habilidade para invadir os tecidos (SULLIVAN et al, 1999).

A associação com episódios recorrentes de candidíase orofaríngea em pacientes HIV positivos sugere que a recente emergência de *C. dubliniensis* como patógeno humano resultou da seleção gerada pelo crescente uso de antifúngicos. A maioria dos isolados é suscetível aos antifúngicos comuns, mas os valores de CIMs gerados para esta espécie são constantemente maiores que aqueles produzidos para *C. albicans* (PFALLER et al, 1999a).

3.2 Tubos germinativos: importância na identificação e como fator de virulência

Tubo germinativo é uma pequena hifa produzida a partir de um blastoconídio e que não apresenta ponto de constrição; tal estrutura se forma *in vitro* na presença de soro ou de albumina sob temperatura de 37°C, durante aproximadamente 3 horas de incubação (SIDRIM & MOREIRA, 1999). Da mesma forma, alguns meios sintéticos, ricos em N-acetil-glicosamina, podem estimular a formação de hifas verdadeiras por *C. albicans* e *C. dubliniensis*; em torno de 90% dos isolados possuem essa propriedade. A produção de tubo germinativo é um teste presuntivo bastante utilizado para distinguir *C. albicans* e *C. dubliniensis* de outras espécies do mesmo gênero que não possuem essa característica fenotípica (SIMONETTI et al, 1974; CASSONE et al, 1985; HUBBARD et al, 1985; SCHAUDE et al, 1987).

C. albicans e *C. dubliniensis* podem se apresentar *in vivo* sob duas morfologias diferentes: fase leveduriforme e fase de pseudo-hifas e de hifas verdadeiras, que constituem a fase filamentosa. A fase leveduriforme é normalmente predominante durante a colonização de superfícies epiteliais, entretanto, a fase filamentosa tem sido associada com a invasão de tecidos (ODDS, 1994). Diversos estudos indicam que isolados de *C. albicans* incapazes de produzir tubo germinativo parecem ser menos virulentos (BENSEN et al, 2002; SAVILLE et al, 2003).

3.3 Antifúngicos azólicos

Os antifúngicos azólicos mais empregados atualmente nos tratamentos das candidíases incluem os imidazóis (cetoconazol e miconazol), triazóis de 1ª geração (fluconazol e itraconazol) e de 2ª geração (voriconazol, posaconazol e ravuconazol) (CHEN & SOBEL, 2005). Os azóis são compostos totalmente sintéticos e que, geralmente, têm ação fungistática sobre determinados fungos. Seu mecanismo de ação consiste, resumidamente, na inibição da síntese do ergosterol do fungo através de ligação à enzima lanosterol 14- α -demetilase, o que provoca alterações na membrana citoplasmática fúngica, impedindo o desenvolvimento do mesmo (GOODMAN & GILMAN, 1996).

O fluconazol possui atividade antifúngica contra a maioria das espécies de *Candida* e *Cryptococcus neoformans* requerendo concentração inibitória mínima (CIM) igual ou menor a 8µg/mL; entretanto, isolados de *C. glabrata* e *C. krusei* apresentam CIMs na faixa de 4 a 16µg/mL, e 16 a 64µg/mL, respectivamente (PFALLER et al, 1997). Da mesma forma, o itraconazol geralmente possui boa atividade *in vitro*, com CIMs entre 0,01 e 1,0µg/mL para a maioria das leveduras isoladas, exceto para *C. glabrata* (0,06 a 8µg/mL) e *C. krusei* (0,5 a 2µg/mL) (ESPINEL-INGROFF et al, 2001).

C. albicans e *C. dubliniensis* são as duas espécies mais suscetíveis aos azóis atualmente disponíveis. Semelhantemente, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae* e *C. guilliermondii* geralmente apresentam-se sensíveis *in vitro* a essa classe de drogas antifúngicas. Entretanto, os valores de CIM para *C. glabrata* e *C. krusei* são habitualmente mais elevados do que para *C. albicans*, visto que as duas primeiras espécies são naturalmente menos suscetíveis aos azóis (MILLON et al, 1994b; REX et al, 1995; REX et al, 1997; COLLIN et al, 1999; PEREA & PATTERSON, 2002).

3.4A emergência da resistência de *Candida* spp aos antifúngicos

Os novos triazóis, particularmente o fluconazol, são largamente utilizados no tratamento de candidíase orofaríngea devido a sua elevada eficácia e baixa toxicidade (REVANKAR et al, 1998). Quadros recorrentes da doença, sobretudo em pacientes com AIDS, exigem ciclos periódicos de tratamento. O uso prolongado do fluconazol em esquemas terapêuticos ou profiláticos pode resultar em três cenários epidemiológicos relacionados a candidíase resistente a este medicamento. Primeiro, a seleção de espécies intrinsecamente resistentes ao fluconazol: *C. krusei* e *C. glabrata*. Segundo, uma amostra de *C. albicans* previamente sensível pode ser substituída por outra da mesma espécie, porém resistente ao fluconazol. Terceiro, um isolado de *C. albicans* sensível pode desenvolver resistência ao fluconazol durante o tratamento (BART-DELABESSE et al, 1993; BARCHIESI et al, 1994; DUPONT et al, 1994; MILLON et al, 1994a; PFALLER et al, 1994; REDDING et al, 1994; SANGEORZAN et al, 1994; COLOMBO et al, 1995; REX et al, 1995; FRANZ et al, 1999).

O termo resistência é usado para descrever uma relativa insensibilidade de um microrganismo frente a uma droga antimicrobiana através de testes *in vitro* e da comparação com outros isolados da mesma espécie (REX et al, 1997).

A resistência pode ser primária, ocorrendo em organismos nunca expostos à droga de interesse num hospedeiro. Contrariamente, resistência secundária, também definida como resistência adquirida, surge somente após a exposição do organismo à droga. Resistência intrínseca é definida como resistência a todos ou à maioria dos isolados de uma espécie a certa droga – por exemplo, a resistência de *C. krusei* ao fluconazol (REX et al, 1997).

O primeiro relato de resistência aos azóis em indivíduos com AIDS foi relacionado ao cetoconazol (TAVITIAN et al, 1986). No entanto, com a introdução do fluconazol no mercado, associado à sua larga utilização nesses pacientes, a maioria das publicações tem se referido à resistência a esse antifúngico (BARCHIESI et al, 1996; RUHNKE et al, 1996; LAGUNA et al, 1997). Relatos de casos de candidíase orofaríngea resistente ao fluconazol começaram a aparecer a partir de 1991, após a introdução desta droga em esquemas terapêuticos ou profiláticos em pacientes com AIDS (FICHTENBAUM et al, 2000).

Redding et al (1994) analisaram um paciente com candidíase orofaríngea recorrente e documentaram, por técnicas de genotipagem, que, em 12 dos 14 episódios, houve permanência de isolado com o mesmo padrão genotípico. Observaram ainda um aumento progressivo das doses de fluconazol (100 a 800mg/dia) para obtenção de eficácia terapêutica. O teste de susceptibilidade *in vitro* demonstrou que a cepa, inicialmente sensível, tornou-se resistente ao fluconazol.

A resistência aos azóis tem sido reportada em 32% dos pacientes sintomáticos e em 14% dos assintomáticos. A imunossupressão avançada, marcada pela redução da contagem de células CD4⁺, e a exposição prévia aos azóis são considerados importantes fatores de risco para o desenvolvimento de candidíase resistente ao fluconazol em pacientes HIV positivos (MAENZA et al, 1996; CANUTO et al, 2000; FICHTENBAUM et al, 2000).

O uso de agentes antifúngicos azólicos como profiláticos parece selecionar leveduras que exibem diminuída suscetibilidade a esses agentes (SANGUINETI et al, 1993; JOHNSON et al, 1995; PEREA & PATTERSON, 2002; LOEFFLER & STEVENS, 2003). Para *C. albicans*, o desenvolvimento de resistência secundária ao tratamento com fluconazol tem sido mais comumente encontrado em pacientes

infectados com HIV que receberam terapia prolongada com esse antifúngico, resultando em recorrentes períodos de candidíase orofaríngea. Da mesma forma, a resistência ao itraconazol vem se destacando nesse grupo de pacientes, principalmente em isolados de *Candida* que exibem diminuída suscetibilidade ao fluconazol *in vitro*, o que demonstra razoável grau de resistência cruzada entre os antifúngicos da classe dos triazóis (SANGUINETI et al, 1993; JOHNSON et al, 1995; LOEFFLER & STEVENS, 2003).

3.5 Mecanismos da resistência de *Candida* spp aos antifúngicos azólicos

Diversos mecanismos que contribuem para o fenômeno da resistência aos antifúngicos azólicos vêm sendo descritos. Entre eles, destacam-se: a superexpressão ou a mutação do gene ERG11 que codifica a enzima alvo dos azóis, a lanosterol 14- α -demetilase (MARICHAL et al, 1999); a superexpressão de genes CDR e MDR que codificam bombas de efluxo (PRASAD et al, 1995; SANGLARD et al, 1995; WHITE et al, 1998); alterações nos genes ERG3 que codificam a enzima $\Delta^{5,6}$ esterol dessaturase, indispensável na biossíntese do ergosterol (HOWELL et al, 1990); alterações na composição lipídica da membrana plasmática fúngica, o que dificulta a entrada, ou seja, o influxo do fármaco na célula (LOEFFLER et al, 2000). Entretanto, diferentes mecanismos, não totalmente elucidados, podem ocorrer, simultaneamente, contribuindo para o fenômeno da resistência (WHITE, 2003).

Resumidamente, os mecanismos de resistência de *Candida* spp aos azóis podem ser explicados da seguinte forma: numa célula sensível, os azóis ganham o interior celular por um mecanismo ainda desconhecido e interagem com a enzima alvo, lanosterol 14- α -demetilase, codificada pelo gene ERG11. Baixos níveis de expressão para os genes CDR e MDR, que codificam bombas de efluxo, são normalmente observados. Por outro lado, numa célula resistente, os azóis, estando no interior celular, podem ser impedidos de interagir com a enzima alvo devido a uma mutação ou superexpressão no gene ERG11; também se pode observar a superexpressão dos genes CDR1 (codificam transportadores da família ABC-ATPase) e MDR1 (codificam os transportadores facilitadores maiores), o que

aumenta o efluxo do fármaco para fora da célula. Mutações em genes que codificam outras enzimas na via de biossíntese do ergosterol, tais como o ERG3, podem também contribuir para resistência. Estes diversos mecanismos não são mutuamente excludentes, pois vários deles têm sido identificados agindo em conjunto em uma cepa resistente (ESPINEL-INGROFF et al, 1999).

Em recente estudo, Perea et al (2001) analisaram os mecanismos de resistência de cepas de *C. albicans* resistentes ao fluconazol isoladas de pacientes infectados com o HIV e com candidíase orofaríngea. Neste contexto, foi confirmada a natureza multifatorial da resistência em 75% dos isolados. Em geral, a superexpressão dos genes que codificam bombas de efluxo (CDR e MDR) foi detectada em 85% dos casos; mutações no gene que codifica a enzima lanosterol 14 α -demetilase (ERG11) em 58-65%, e a superexpressão deste gene em 35-42% dos isolados clínicos resistentes aos azóis.

Análises genéticas e moleculares têm determinado que bombas de efluxo codificadas por genes CDR agem em todos os azólicos comumente utilizados na clínica, enquanto que as codificadas por genes MDR1 parecem ser específicas para o fluconazol (WHITE, 1997; WHITE et al, 1998). Estes achados têm implicações clínicas profundas, pois cepas resistentes ao fluconazol expressando o gene MDR1 devem ser suscetíveis a outros azóis, enquanto que cepas expressando gene CDR devem apresentar resistência cruzada com outros azólicos (ESPINEL-INGROFF et al, 1999).

Goldman et al (2004) descreveram mecanismos de resistência ao fluconazol em *C. albicans* isoladas de nove pacientes com AIDS internados em hospitais brasileiros. Estes mecanismos incluíram a presença de pontos de mutação e superexpressão do gene ERG11 e de vários genes que codificam bombas de efluxo. Diversas cepas resistentes tiveram múltiplos mecanismos de resistência.

Candida dubliniensis tem sido recentemente descrita como um patógeno oportunista associado com candidíase oral em pacientes infectados pelo HIV. (SULLIVAN et al, 1997; ODDS et al, 1998; BRANDT et al, 2000; JABRA-RIZK et al, 2000). Embora estudos preliminares indiquem que a maioria dos isolados desta espécie é sensível ao fluconazol, amostras resistentes têm sido detectadas. Neste contexto, observa-se que *C. dubliniensis* isolada de pacientes com AIDS facilmente desenvolve resistência *in vitro* ao fluconazol. Este fenômeno está geralmente associado ao aumento da expressão do gene MDR1 que codifica proteínas da

bomba de efluxo (MORAN et al, 1998; WIRSCHING et al, 2001; GUTIERREZ et al, 2002).

Candida krusei é intrinsecamente resistente ao fluconazol. Um mecanismo estabelecido para tal ocorrência é o efluxo da droga por transportadores da família ABC-ATPase; como estes transportadores reconhecem estruturalmente diversos fármacos, sua superexpressão pode resultar em resistência a multifármacos (KATIYAR & EDLIND, 2001). Para a espécie *C. glabrata*, os principais mecanismos de resistência aos azóis incluem alterações no gene ERG11 e superexpressão dos genes CDR1 e CDR2. Dados de CIM para todos os isolados resistentes ao fluconazol revelaram extensa resistência cruzada com outros azóis testados, como itraconazol, cetoconazol e voriconazol (VERMITSKY & EDLIND, 2004; SANGUINETTI et al, 2005).

3.6 Resistência cruzada

A resistência cruzada entre os azóis tem sido comumente observada (LOEFFLER & STEVENS, 2003). Além desta, pode também haver resistência cruzada entre azóis e poliênicos. Acredita-se que a superexpressão de genes CDR torna uma célula resistente a diferentes azóis, enquanto que a superexpressão de MDR1 parece ser específica para a resistência ao fluconazol, não estando associada à resistência cruzada. R467K é um ponto de mutação no gene ERG11 que está associado com resistência; parece causar resistência cruzada a outros azóis, no entanto, ainda não está claro se pontos de mutação específicos em ERG11 sempre estarão associados com resistência cruzada. Atualmente ainda há análises insuficientes para determinar se as alterações em outras enzimas que fazem parte da biossíntese do ergosterol resultam em resistência cruzada (WHITE et al, 1998).

Recentes estudos revelam que resistência cruzada entre fluconazol e ravuconazol é observada principalmente em *C. glabrata* resistente ao fluconazol, e é variável entre outras espécies de *Candida* (PFALLER et al, 2004). Segundo Borst et al (2005), cinco isolados de *C. glabrata* suscetíveis aos azóis, obtidos antes de 1975, transformaram-se em resistentes ao fluconazol, itraconazol e voriconazol no período de dias de exposição ao fluconazol *in vitro*. Esta resistência cruzada foi estável por

quatro meses após remoção de fluconazol e foi associada com aumento da expressão dos genes CDR1 e CDR2.

3.7 Técnicas de avaliação da resistência

Para a avaliação da suscetibilidade de fungos leveduriformes frente a determinado agente antifúngico, são utilizadas técnicas que forneçam resultados de concentração inibitória mínima (CIM). Atualmente, a metodologia mais usada baseia-se na micro ou macrodiluição em caldo, padronizada no documento M27-A2 do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) (NCCLS, 2002). Recentemente, métodos para padronizar testes de suscetibilidade *in vitro* para *Candida* spp têm sido desenvolvidos. Os mesmos correlacionam-se com resultados obtidos de pacientes com AIDS e candidíase orofaríngea. Isolados com CIM $\leq 8\mu\text{g/mL}$ ao fluconazol são considerados suscetíveis a este agente; com CIM entre 16 e $32\mu\text{g/mL}$, são ditos suscetíveis dose-dependente, ou seja, possuem CIM intermediária, sendo considerados de suscetibilidade reduzida, porque as infecções causadas por esses isolados podem responder a altas doses de fluconazol; e, por fim, cepas com CIM $\geq 64\mu\text{g/mL}$ são consideradas resistentes ao fluconazol (REX et al, 1997). Outras técnicas que também podem ser utilizadas como método para determinação de CIMs para leveduras são o EUCAST (*European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing*), fundamentado na diluição em caldo (EUCAST, 2002), e o Etest, o qual se baseia na difusão em ágar de um agente antimicrobiano presente numa fita plástica (ESPINEL-INGROFF, 1994; COLOMBO et al, 1995; ESPINEL-INGROFF & PFALLER, 2003); além destes, vários outros sistemas estão disponíveis comercialmente ou em acelerado desenvolvimento.

3.8 Óleos essenciais

Óleos essenciais, conforme a ISO 9235:1997 (International Standard Organization), são produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste com vapor d'água, bem como os produtos obtidos pelo processamento mecânico dos pericarpos de frutos cítricos (Rutaceae). De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, normalmente odoríferas e líquidas (ISO 9235, 1997; 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 composição de óleos essenciais extraídos de plantas da mesma espécie pode variar significativamente. Entre as causas deste fenômeno destacam-se: a existência de quimiotipos (vegetais idênticos botanicamente, mas que diferem quanto a algumas características químicas), o ciclo vegetativo da planta, o horário da coleta do material vegetal e o processo empregado na obtenção do óleo essencial (SIMÕES et al, 1999).

3.9 Plantas com atividade antimicrobiana

Alguns extratos de plantas e seus metabólitos secundários possuem efeitos

inibitórios e letais dose-dependente sobre diferentes microrganismos (SMITH-PALMER et al, 1998). Desde a antiguidade, sabe-se que muitos óleos voláteis evidenciam propriedades antifúngicas e, desta forma, são potencialmente aplicáveis como agentes antimicóticos (DEANS et al, 1989). A maioria destas substâncias possui atividade contra fungos e bactérias devido à presença de monoterpenos. Neste contexto, Tampieri et al (2005) determinaram a atividade *in vitro* de dezesseis óleos essenciais e seus constituintes majoritários frente a diferentes microrganismos, incluindo isolados de *Candida albicans*. Entre outros óleos essenciais, os de *Origanum vulgare* (orégano), *Ocimum basilicum* (manjeriço), *Thymus vulgaris* (tomilho) e *Rosmarinus officinalis* (alecrim) apresentaram ação fungistática contra *C. albicans*, após 48 horas de incubação, com CIMs de 500ppm para os dois primeiros, 1000ppm e 5000ppm para os dois últimos, respectivamente. Os constituintes majoritários identificados nesses óleos foram: carvacrol (55,08%), p-cimeno (15,14%) e γ -terpineno (4,75%) para o orégano; estragol (74,5%) e linalol (20,3%) para o manjeriço; 1,8-cineol (26,7%), α -pineno (25,8%), cânfora (8,54%), canfeno (8,20%) e limoneno (4,25%) para o alecrim; carvacrol (41,33%), p-cimeno (17,53%), γ -terpineno (9,92%), cariofileno (5,81%) e timol (5,34%) para o tomilho. Com relação aos componentes isolados, carvacrol foi o composto mais ativo entre os fenólicos; e, entre os aldeídos, o de maior atividade foi o trans-cinamaldeído. Dentre outras conclusões, observou-se que os óleos essenciais que possuem carvacrol, tais como os de orégano e de tomilho, são ativos contra *C. albicans*.

Chami et al (2004) estudaram *in vivo* e *in vitro* a ação terapêutica do carvacrol e do eugenol frente à infecção oral por *C. albicans* em ratos imunodeprimidos. *In vitro*, os autores comprovaram a intensa atividade antifúngica do carvacrol e do eugenol que evidenciaram CIMs de 6,5mM e 12mM, respectivamente, concluindo que o carvacrol é mais eficaz do que o eugenol. No teste *in vivo*, utilizaram dosagens duas vezes maiores que os valores de CIMs encontrados nos experimentos *in vitro*, obtendo-se desta forma, resposta clínica satisfatória .

Burt et al (2003) observaram que os óleos essenciais de orégano e tomilho possuem significativa atividade bacteriostática e bactericida contra *E. coli* O157:H7, importante patógeno com atividade entero-hemorrágica ao homem. Da mesma forma, diversos estudos têm evidenciado que os óleos essenciais de orégano, tomilho e cravo demonstram forte atividade frente a isolados de *E. coli* (SMITH-PALMER et al, 1998; HAMMER et al, 1999; DORMAN & DEANS, 2000). Em geral,

as análises químicas desses óleos têm apontado como constituintes majoritários o carvacrol, o timol, o citral, o eugenol, entre outros (SALZER, 1977; LATTAOUI & TANTAOUI-ELARAKI, 1994; DEMETZOS & PERDETZOGLU, 2001). Entretanto, a composição dos óleos essenciais de cada espécie em particular pode variar em virtude da época da colheita da planta, das condições climáticas e de diferenças geográficas (SIMÕES et al, 1999; COSENTINO et al, 1999); em consequência disso, pode haver alterações nas propriedades antimicrobianas do óleo.

Nostro et al (2004) realizaram um estudo sobre a atividade do óleo essencial de orégano e seus componentes principais, carvacrol e timol, frente a *Staphylococcus* spp resistentes e sensíveis a meticilina. Segundo os autores, todos os isolados de *S. aureus* e *S. epidermidis* foram suscetíveis ao óleo de orégano, ao carvacrol e ao timol, não sendo evidenciadas diferenças estatísticas significativas entre a suscetibilidade das cepas resistentes e sensíveis a meticilina.

Santurio et al (2007) pesquisaram a ação antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sessenta amostras de *Salmonella enterica* distribuídas entre 20 sorovares isoladas de carcaças de aves. A concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) foram determinadas para cada isolado utilizando-se a técnica de microdiluição em caldo. O óleo essencial de orégano evidenciou forte atividade antibacteriana (CIM média = 510 µg/ml e CBM média= 661µg/ml), seguido do tomilho (CIM média= 961 µg/ml e CBM média= 1074 µg/ml) com atividade moderada; por outro lado, a menor ação foi observada com o óleo essencial de canela (CIM média= 1335 µg/ml e CBM média= 1979µg/ml).

Sartoratto et al (2004) pesquisaram a composição e a atividade antimicrobiana de óleos essenciais derivados de plantas odoríferas utilizadas no Brasil. Os óleos essenciais de orégano e tomilho demonstraram forte atividade contra *Enterococcus faecium*, e moderada atividade contra *Salmonella choleraesuis*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*. Da mesma forma, o óleo de manjerição evidenciou inibição moderada frente a *S. aureus*. Observaram-se, também, CIMs de 2mg/mL frente a *C. albicans* para os óleos de orégano e tomilho; entretanto o óleo essencial de manjerição não demonstrou atividade contra esta levedura nas concentrações testadas (CIM >2mg/mL). Os constituintes majoritários identificados nos óleos essenciais foram: timol (38,0%), terpin-4-ol (33%), α-terpineol (4,25%) e γ-

terpineno (1,99%) para o orégano; timol (79,15%) e p-cimeno (3,27%) para o tomilho; linalol (32,6%), eugenol (28,1%) e cânfora (10,1%) para o manjeriço. Neste estudo, os autores classificaram as atividades antimicrobianas como forte quando os valores de CIM encontraram-se entre 0,05 e 0,50 mg/mL, moderada atividade com CIM entre 0,6 e 1,50 mg/mL e fraca atividade com CIM acima de 1.50 mg/mL.

A ação inibitória dos óleos essenciais de doze plantas medicinais foi avaliada frente a *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus* e *Fusarium moniliforme*. Entre outros, os óleos de tomilho, canela e manjeriço inibiram completamente todos os fungos testados nas CIMs \leq 500 ppm para os dois primeiros e 3000 ppm para o último (SOLIMAN & BADEAA, 2002).

No Brasil, Duarte et al (2005) avaliaram a atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos etanólicos de trinta e cinco plantas medicinais comumente usadas, frente a *C. albicans*. Os óleos de treze plantas demonstraram atividade contra a levedura, porém os extratos etanólicos não foram efetivos nas concentrações analisadas. Evidenciaram-se as seguintes CIMs para os óleos essenciais contra *C. albicans*: $>2,0$ mg/mL para o manjeriço e orégano, e 2,0mg/mL para o tomilho. As análises químicas destes óleos não foram citadas pelos autores.

Giordani et al (2004) investigaram as propriedades antifúngicas de alguns óleos essenciais incluindo os de *Origanum vulgare* L., *Rosmarinus officinalis* L. e seis quimiotipos de *Thymus vulgaris* L. frente a *C. albicans*. O óleo de orégano apresentou CIM 80% de 0,421 μ L/mL, enquanto que o de alecrim evidenciou 5,609 μ L/mL. As análises por CG-EM demonstraram como constituintes majoritários: carvacrol (81,94%) e timol (9,04%) para o orégano; α -pineno (26,19%), 1,8-cineol (24,36%), cânfora (18,85%) e canfeno (10,53%) para o alecrim. Entre os diferentes óleos de tomilho analisados, o que apresentou menor ação foi o quimiotipo com 29,84% de 4-tujanol e 21,8% de terpineno-4-ol, o qual evidenciou CIM de 5,915 μ L/mL; por outro lado, o mais eficiente foi o quimiotipo timol (63,22% de timol e 19,20% de p-cimeno), que demonstrou CIM 80% de 0,016 μ L/mL. A presença deste óleo nas concentrações entre 0,01 e 0,3 μ g/mL, juntamente com anfotericina B, gerou efeito sinérgico, diminuindo os valores de CIM 80% desta droga. Por outro lado, a combinação de anfotericina B com o óleo essencial em concentrações menores (0,00031–0,0025 μ g/mL) demonstrou antagonismo. Estes resultados indicam que, em determinada concentração, o óleo essencial de tomilho com alto conteúdo de timol potencializa a ação antifúngica da anfotericina B.

Arfa et al (2006) investigaram a relação entre a estrutura química e a atividade antimicrobiana do carvacrol, eugenol, mentol e dois compostos sintéticos derivados do carvacrol: seu éter metílico e acetato de carvacril. Os microrganismos avaliados incluíram as bactérias *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *S. aureus*, *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis*, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e o fungo *Botrytis cinerea*. Eugenol e mentol exibiram menor atividade antimicrobiana do que carvacrol, que é o composto mais hidrofóbico. O acetato de carvacril e o éter metílico do carvacrol não foram eficientes, indicando que a presença de grupo hidroxila livre é essencial para atividade antimicrobiana. Neste contexto, os autores sugerem que as diferentes faixas de ação antimicrobiana dos compostos odoríferos indicam que a hidrofobicidade, além da presença de um grupo hidroxila livre que permita a movimentação de prótons, são importantes fatores que contribuem para uma potente atividade antimicrobiana.

Lambert et al (2001) avaliaram a CIM do óleo essencial de orégano, do timol e do carvacrol contra *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Foram testadas as substâncias isoladamente e em mistura. Após as análises, concluiu-se que a mistura de carvacrol com timol teve efeito aditivo, sugerindo-se que a atividade antimicrobiana do óleo essencial de orégano pode ser atribuída a estes dois compostos. Em conclusão, observou-se que a mistura de carvacrol e timol é mais efetiva do que o óleo essencial de orégano.

Os óleos essenciais de *Ocimum basilicum* L., *Origanum vulgare* L., e *Thymus vulgaris* L. foram analisados por CG-EM e testados quanto as suas propriedades antioxidante e antimicrobiana. Os principais componentes químicos identificados nos óleos essenciais foram: metil-chavicol (45.8%) e linalol (24.2%) no óleo de *O. basilicum*; carvacrol (61.3%) e timol (13.9%) no *O. vulgare*; timol (47,9%), γ -terpineno (8.3%) e carvacrol (5,9%) no óleo de *T. vulgaris*. O óleo essencial de orégano expressou atividade antimicrobiana mais efetiva, mesmo frente a espécies multiresistentes como *P. aeruginosa* e *E. coli*. Da mesma forma, o óleo de orégano evidenciou melhor ação antifúngica, seguido pelo tomilho e pelo manjeriço, frente a *C. albicans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum* e *Microsporium canis* (BOZIN et al, 2006).

Estudando as suscetibilidades de diferentes espécies de *Candida*, Vazquez et al (2000) avaliaram a ação do óleo de *Melaleuca alternifolia* (árvore do chá). A espécie mais suscetível foi *C. albicans*, seguida por *C. lusitaniae* e *C. guilliermondii*,

C. krusei e *C. tropicalis*, sendo *C. glabrata* a espécie menos suscetível ao óleo de *M. alternifolia*. Além disso, observou-se atividade deste óleo frente a cepas de *C. albicans* e *C. glabrata* resistentes ao fluconazol, sendo evidenciadas concentrações efetivas iguais tanto para as cepas resistentes quanto para as sensíveis.

3.10 Mecanismos de ação antimicrobiana dos óleos essenciais

As propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais estão descritas em diversos estudos; por outro lado, os mecanismos de ação destes compostos e seus constituintes não estão totalmente estabelecidos. Sugere-se que a maioria dos óleos essenciais exerça sua atividade antimicrobiana através de modificações na estrutura da parede celular do microrganismo. Mais especificamente, alteram a permeabilidade da membrana citoplasmática pela modificação no gradiente de íons de hidrogênio (H^+) e potássio (K^+). Esta alteração conduz à deterioração de processos essenciais à sobrevivência da célula tais como o transporte de elétrons, o transporte de proteínas, passos da fosforilação e outras reações dependentes de enzimas. Desta forma, ocorre perda do controle quimiosmótico da célula e a conseqüente morte do microrganismo (DORMAN & DEANS, 2000). Sugere-se também que o rompimento da parede celular bacteriana deva-se ao caráter lipofílico dos óleos essenciais que se acumulam nas membranas (COWAN, 1999). Em estudo realizado por Lambert et al (2001), demonstrou-se que, em geral, os monoterpenos 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 *P. aeruginosa* e *S. aureus* resultando no aumento da permeabilidade em 90% das células destes microrganismos. A ação antimicrobiana dos óleos essenciais pode ser também devida à inativação de algumas enzimas, incluindo as envolvidas na produção de energia e síntese dos componentes estruturais.

Andrews et al (1980) estudaram os efeitos tóxicos de α -pineno e alguns outros terpenos em cepas de *Bacillus* e de *Saccharomyces cerevisiae*, evidenciando que α -pineno, limoneno, canfeno e acetato de isobornila inibiram tais

microrganismos. Efeitos similares foram observados para o β -pineno em células leveduriformes (URIBE et al, 1985).

Diversas investigações têm sido realizadas com o intuito de elucidar o mecanismo de ação dos óleos frente a bactérias Gram-negativas (WEIS et al, 1985; SIKKEMA et al, 1994; SIKKEMA et al, 1995; HELANDER et al, 1998) e Gram-positivas (ULTEE et al, 1999). As bactérias Gram-negativas possuem uma membrana externa rica em lipopolissacarídeos, responsáveis pelo caráter hidrofílico da superfície, que funciona como uma barreira à permeabilidade das substâncias hidrofóbicas tais como os constituintes de muitos óleos essenciais. Isto pode explicar a reduzida suscetibilidade das bactérias Gram-negativas ao efeito antibacteriano de alguns óleos essenciais (COWAN, 1999; DORMAN & DEANS, 2000; CHAO et al, 2000). Por outro lado, as bactérias com parede celular hidrofóbica têm maior afinidade por compostos hidrofóbicos do que aquelas com parede celular mais hidrofílica (VAN LOOSDRECHT et al, 1990; JARLIER & NIKAIDO, 1994). Isto sugere que modificações na parede celular (hidrofóbica para hidrofílica) podem acarretar proteção ao microrganismo contra compostos lipofílicos. Neste sentido, Park et al (1988) demonstraram que *S. cerevisiae* adaptou-se à presença de solventes tóxicos (tributilfosfato e 2-*terc*-butilfenol) por diminuição da hidrofobicidade da sua parede celular.

Pinto et al (2006) avaliaram a composição, a atividade antifúngica e mecanismo de ação do óleo essencial de *Thymus pulegioides* sobre *Candida*, *Aspergillus* e *dermatófitos*. As análises químicas do óleo, obtidas por CG e CG-EM, demonstraram alto conteúdo de carvacrol e timol. Através de estudos de citometria de fluxo e análise do ergosterol na membrana fúngica, evidenciou-se que os danos na membrana citoplasmática eram os principais mecanismos de ação antifúngica, além de uma considerável redução do conteúdo de ergosterol. O ergosterol é a molécula lipídica predominante nas células leveduriformes com função de regular a fluidez e a permeabilidade da membrana, bem como a atividade de muitas enzimas. Desta forma, as atividades funcionais do ergosterol desempenham função importante no crescimento celular, e sua redução pode acarretar prejuízos à célula (PARVEEN et al, 2004).

Pina-Vaz et al (2004) determinaram a atividade antifúngica dos óleos essenciais de tomilho (*Thymus vulgaris*, *T. zygis* e *T. mastichina*). O principal mecanismo de ação antifúngica observado foi lesão na membrana celular. Da

mesma forma, Salgueiro et al (2003b) estudaram a composição e atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Origanum virens* frente a espécies de *Candida*. O óleo essencial caracterizou-se pelo alto conteúdo de carvacrol (68.1 %) e seus precursores biogénéticos, γ -terpineno (9.9 %) e p-cimeno (4.5 %). Deste estudo, entre outras conclusões, observou-se que o efeito fungicida é principalmente devido à extensa lesão na membrana celular. De forma semelhante, Chami et al (2004) avaliaram o mecanismo de ação fungicida do timol e do eugenol, compostos fenólicos majoritários nos óleos essenciais de tomilho e cravo, respectivamente, sobre *S. cerevisiae*. Em resumo, observaram que a atividade antifúngica destas substâncias envolve alterações tanto na membrana quanto na parede celular da levedura.

O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* exibe amplo espectro de atividade antimicrobiana. Seu modo de ação contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus*, e contra *C. albicans* foi investigado por Cox et al (2000). Desta pesquisa, concluíram que a exposição destes microrganismos ao óleo inibiu a respiração celular e aumentou a permeabilidade das membranas citoplasmáticas bacterianas e fúngicas. No caso da *E. coli* e do *S. aureus*, o óleo também causou alterações no gradiente de íons potássio. Por fim, a habilidade desse óleo em romper as barreiras estruturais da membrana celular, acompanhada da perda do controle quimiosmótico, é a mais conhecida forma de sua ação letal e inibitória. Da mesma forma, Hammer et al (2004) investigaram o mecanismo de ação do óleo de *Melaleuca alternifolia* e seus componentes majoritários contra *C. albicans*, *C. glabrata* e *Saccharomyces cerevisiae*. Durante o estudo, alterações na permeabilidade e fluidez da membrana citoplasmática foram também observadas.

3.10.1 Toxicidade dos óleos essenciais

Os óleos essenciais freqüentemente apresentam toxicidade elevada podendo causar intoxicações aguda e crônica. A toxicidade decorrente do uso tópico pode manifestar-se como fototoxicidade e alergias, sendo, geralmente, dose-dependente; entretanto, existem situações nas quais baixas doses podem provocar reações severas. Contudo, a maior parte dos dados relativos à toxicidade dos óleos diz

respeito à administração oral (SIMÕES et al, 1999).

Chami et al (2004), ao avaliarem as atividades do carvacrol e eugenol frente a candidíase oral em ratos imunodeprimidos, não observaram toxicidade aguda nas doses utilizadas (160 e 380µg/kg), categorizando essas substâncias como agentes promissores para tratamento de candidíase oral.

3.11 Condimentos e seus óleos essenciais

De acordo com a Resolução CNNPA, nº 12, de 1978, 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).

3.11.1 *Cinnamomum zeylanicum* (Canela)

O óleo essencial de canela, bem como a canela em pó, são empregados na preparação de alguns medicamentos na área farmacêutica. Esta planta apresenta propriedades estomáquica, carminativa e emenagoga (SOUZA et al, 1991). Seu óleo essencial é rico em cinamaldeído, acompanhado do ácido cinâmico, eugenol e linalol (LORENZI & MATOS, 2002).

Quale et al (1996) pesquisaram a atividade *in vitro* do óleo de canela frente a isolados de *Candida* spp sensíveis e resistentes ao fluconazol. Foram encontradas CIMs entre 0,05mg/mL e 30mg/mL para o óleo da casca da canela; e 25 a 100mg/mL para doces e gomas derivados da canela. No mesmo estudo, cinco pacientes com HIV e candidíase oral receberam uma preparação de canela, disponível comercialmente, durante uma semana. Após o tratamento, três dos cinco pacientes evidenciaram redução no quadro de candidíase, o que sugere novos estudos objetivados a determinar o uso da canela na candidíase orofaríngea.

O aldeído cinâmico tem sido identificado como constituinte antifúngico do óleo essencial da casca da canela. Neste contexto, Singh et al (1995) investigaram as

propriedades dos vapores do óleo essencial de canela e de seus constituintes ativos frente a fungos envolvidos em micoses do trato respiratório, tais como *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. flavus*, *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis* e *Histoplasma capsulatum*. CIM e CFM foram determinadas *in vitro*, concluindo-se que os vapores do óleo essencial da casca de canela podem representar uma forma de tratamento de micoses do trato respiratório.

3.11.2 *Lippia graveolens* (orégano mexicano)

Lippia graveolens, popularmente denominada orégano mexicano, é um vegetal utilizado como condimento, e está documentado unicamente na Farmacopéia Mexicana. Estudos antibacterianos demonstraram que a tintura de *L. graveolens* é ativa contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *S. flexneri*, *S. aureus*, *S. pneumoniae* e *S. pyogenes*. Da mesma forma, ensaios de atividade antifúngica evidenciaram que seus extratos diclorometânico e etanólico são ativos contra *C. albicans*, *Aspergillus flavus*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum gypseum* e *Trichophyton rubrum*, e são inativos contra *Cryptococcus neoformans* (CÁCERES, 1999). A composição e a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Lippia graveolens* coletada na Guatemala foram estudadas e caracterizadas pelo alto conteúdo de monoterpenóides (70,0 a 87,2%). Importantes diferenças entre os constituintes majoritários foram encontradas, particularmente para o carvacrol (0,2 a 44,8%), timol (7,4 a 18,1%) e *p*-cimeno (6,8 a 21,8%). Todos os óleos demonstraram significativa atividade contra as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas testadas, bem como contra os fungos. Entretanto, os óleos com conteúdo maior de carvacrol do que de timol demonstraram atividade antimicrobiana superior, com CIMs na faixa entre 0,25 e 0,83 µL/mL para bactérias, e de 0,12 a 0,27µL/mL para fungos (SALGUEIRO et al, 2003a).

Vazquez e Dunford (2005) analisaram amostras de óleos essenciais de orégano mexicano, evidenciando na sua composição timol, carvacrol e *p*-cimeno, e em menores quantidades, 1,8-Cineol e γ -terpineno. Da mesma forma, Vernin et al (2001) investigaram a composição dos óleos essenciais de duas amostras de *Lippia graveolens* através de CG e CG-EM. Quarenta e cinco compostos, constituindo 92-

93% do óleo, foram identificados, sendo que os dois constituintes majoritários em ambas as amostras foram carvacrol (71% e 34,6%) e timol (5 e 7%).

3.11.3 *Ocimum basilicum* (Manjericão)

O manjericão 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 mesmo é ativo contra bactérias como *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *S. aureus*, e alguns fungos, incluindo: *C. albicans*, *A. flavus*, *C. neoformans*, *H. capsulatum*, *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* (CÁCERES, 1999).

O óleo essencial de manjericão, obtido das partes aéreas de *Ocimum basilicum* L., foi analisado por CG, evidenciando os seguintes componentes: linalol (54,95%), metil-chavicol (11,98%), metil-cinamato (7,24%) e linoleno (0,14%). A atividade antimicrobiana desse óleo contra isolados clínicos dos gêneros *Staphylococcus*, *Enterococcus* e *Pseudomonas* foi estudada, demonstrando CIMs entre 0,003% e 0,0007% (v/v), o que indica potente efeito inibitório do óleo essencial de manjericão frente às bactérias testadas (OPALCHENOVA & OBRESHKOVA, 2003).

3.11.4 *Origanum vulgare* (Orégano)

O orégano atua como tônico geral, digestivo, espasmolítico, carminativo, expectorante, anti-séptico das vias respiratórias e emenagogo; topicamente é analgésico, cicatrizante, anti-séptico e antifúngico. Seu óleo essencial é rico em carvacrol, timol e terpineol (CÁCERES, 1999). Há evidências de que óleos essenciais do gênero *Origanum* apresentem atividade contra bactérias Gram-negativas como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*,

Yersinia enterocolitica e *Enterobacter cloacae*; e contra Gram-positivas como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus subtilis* (ELGAYYAR et al, 2001; ALIGIANNIS et al, 2001). Da mesma forma, apresentam ação antifúngica contra *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *Aspergillus niger*, *Geotrichum* e *Rhodotorula* (SIVROPOULOU et al, 1996). Entre os componentes isolados, os compostos fenólicos carvacrol e timol possuem os níveis mais altos de atividade contra bactérias Gram-negativas, exceto para *P. aeruginosa*, sendo o timol mais efetivo (SIVROPOULOU et al, 1996; ELGAYYAR et al, 2001). Outros compostos, como γ -terpineno e *p*-cimeno, normalmente não evidenciam atividade contra bactérias e fungos (SIVROPOULOU et al, 1996; ALIGIANNIS et al, 2001).

Manohar et al (2001) avaliaram a atividade antifúngica do óleo essencial de orégano demonstrando que este possui efeito fungicida contra *C. albicans*, além de inibir a formação de tubo germinativo desta levedura. Neste estudo, as propriedades antifúngicas do óleo de orégano foram examinadas *in vitro* e *in vivo* frente a *C. albicans*. A metodologia usada *in vitro* foi a microdiluição em caldo, onde se observou inibição completa do crescimento da levedura a 0,25 mg/ml. Inibições de 75% e maior que 50% do crescimento foram observadas a 0,125 mg/ml e a 0,0625 mg/ml, respectivamente. A eficácia terapêutica do óleo de orégano foi avaliada *in vivo* usando camundongos como animais modelo. Um grupo de animais infectados com *C. albicans* foi tratado com óleo de orégano sob administração oral diária de 8,6 mg do óleo diluído em 100 μ l de óleo de oliva por quilograma de peso corporal durante 30 dias; como resultado, 80% dos animais sobreviveram, dado oposto ao observado no grupo de animais tratados apenas com óleo de oliva, os quais evoluíram ao óbito em 10 dias. Resultados similares foram obtidos utilizando carvacrol.

Óleos essenciais de *Origanum vulgare* foram analisados por CG e CG/EM, evidenciando hidrocarbonetos mono e sesquiterpênicos como os compostos dominantes, totalizando cerca de 49,8–76,8% do óleo essencial nas inflorescências e 41,9–71,4% nas folhas. O conteúdo de fenóis (timol e carvacrol) demonstrou-se baixo, em torno de 5%. Os óleos essenciais foram avaliados frente a determinados fungos, demonstrando atividade antifúngica potente contra *Fusarium avenaceum*, *Paecilomyces variotii*, *Rhizopus stolonifer* e *Scopulariopsis brevicaulis*. Os microrganismos mais resistentes aos óleos testados foram: *Candida glabrata*,

Saccharomyces cerevisiae, *Geotrichum candidum*, *Aureobasidium pullulans*, *Acremonium furcatum*. Por fim, concluiu-se que os óleos essenciais diferiram altamente tanto na sua composição quanto na atividade antimicrobiana (RADUÐIENĚ et al, 2005).

Os óleos essenciais obtidos de partes aéreas de *Origanum scabrum* e *Origanum microphyllum*, ambas espécies freqüentes na Grécia, foram analisados por CG e CG-EM. Carvacrol, terpinen-4-ol, linalol, sabineno, α -terpineno e γ -terpineno foram os compostos majoritários encontrados. Além disso, ambos os óleos exibiram interessante perfil antimicrobiano frente a determinadas bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e frente a fungos patogênicos. A pesquisa dos valores de CIM para fungos evidenciou: 1,27 mg/mL frente a *C. albicans*, 1,23 mg/mL frente a *C. tropicalis*, e 0,65 mg/mL contra *C. glabrata* para o óleo essencial de *O. scabrum*; 3,23 mg/mL frente a *C. albicans*, 2,89 mg/mL frente a *C. tropicalis*, e 1,81 mg/mL contra *C. glabrata* para o óleo essencial de *O. microphyllum*; 1 mg/mL contra a *C. albicans* e *C. tropicalis*, e 0,35 mg/mL frente a *C. glabrata* para o carvacrol; γ -terpineno e *p*-cimeno não demonstraram atividade frente às leveduras testadas (ALIGIANNIS et al, 2001).

3.11.5 *Rosmarinus officinalis* (Alecrim)

O alecrim é utilizado popularmente no tratamento de amigdalites, anemias, bronquite, cefaléia, cólica, indigestão, náusea, entre outros (CÁCERES, 1999).

Mangena & Muyima (1999) pesquisaram a ação antimicrobiana de três plantas, incluindo o alecrim, através da técnica de difusão em ágar. Dessa forma, observaram que *Acinetobacter lwoffii*, *Shigella flexneri*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterobacter aerogenes*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *B. subtilis*, *Erwinia carotovora*, *S. aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella enteritidis* e *S. typhi* apresentaram-se suscetíveis ao óleo essencial de alecrim, enquanto que *Pseudomonas aeruginosa* e *P. fluorescens* não demonstraram sensibilidade ao mesmo. Em geral, as bactérias Gram-positivas evidenciaram-se mais sensíveis ao óleo do que as Gram-negativas. Além disso, observou-se também ação frente a *S. cerevisiae* e a 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%).

Santoyo et al (2005) investigaram a composição química e a atividade antimicrobiana de diferentes frações de óleo essencial de alecrim. Através de análise por CG-EM, foram identificados 33 compostos; os principais foram α -pineno, 1,8-cineol, cânfora, verbenona e borneol, constituindo cerca de 80% do total do óleo. Todas as frações evidenciaram atividade antifúngica contra *C. albicans* e *Aspergillus niger*.

3.11.6 *Salvia officinalis* (Sálvia)

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 (CÁCERES, 1999). Seu óleo essencial é rico em terpenóides como tujona, cineol, cânfora, borneol, ácido ursólico (LORENZI & MATOS, 2002).

A atividade antibacteriana de óleos essenciais extraídos das plantas medicinais *Salvia officinalis*, *Ocimum gratissimum* e *Cymbopogon citratus* foi avaliada frente a patógenos isolados do trato urinário. *S. officinalis* mostrou destacada atividade inibitória quando comparada às outras duas espécies vegetais, evidenciando 100% de eficiência sobre *Klebsiella* spp e *Enterobacter* spp, 96% contra *Escherichia coli*, 83% contra *Proteus mirabilis*, e 75% frente a *Morganella morganii* (PEREIRA et al, 2004).

Em pesquisa realizada por Velickovic et al (2003), o óleo essencial de *S. officinalis* apresentou 21,5% de cis-tujona, 16,2% de 1,8-cineol, 4,0% de cânfora, 3,9% de α -pineno, 2,7% de trans-tujona, 2,0% de canfeno, 0,8% de limoneno e 0,4% de linalol. Além da análise química, foi realizada uma triagem da atividade antimicrobiana do óleo essencial através da técnica de difusão em ágar. Como resultado, o óleo dessa planta mostrou-se ativo frente a *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *C. albicans*, *S. cerevisiae* e *A. niger*, sendo os halos de inibição de crescimento maiores para as bactérias do que para os fungos testados. O mesmo não foi efetivo contra *S. enteritidis*, *P. aeruginosa* e *Sarcina lutea*.

3.11.7 *Thymus vulgaris* (Tomilho)

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).

Os óleos essenciais de *Thymus* (*Thymus vulgaris*, *T. zygis* sub-espécies *zygis* e *T. mastichina* subespécies *mastichina*) foram investigados frente a espécies de *Candida*. As propriedades antifúngicas dos principais componentes (carvacrol, timol, *p*-cimeno e 1,8-cineol) e possíveis interações entre eles também foram analisadas. Como resultado da pesquisa, os óleos de *T. vulgaris* e *T. zygis* mostraram atividade antifúngica similar, porém superior ao óleo de *T. mastichina*. Os constituintes majoritários encontrados nos óleos foram: 70,3% de carvacrol, 11,7% de *p*-cimeno e 0,6% de timol para o óleo essencial de *T. vulgaris*; 39,6% de timol, 21,2% de *p*-cimeno e 2,4% de carvacrol no óleo de *T. zygis*; 67,4% de 1,8-cineol, 4,3% de linalol e 4,0% de β -pineno para o óleo essencial de *T. mastichina*. Dentre os compostos estudados, carvacrol, timol e *p*-cimeno foram os mais ativos, correlacionando-se com a forte atividade de *T. vulgaris* e *T. zygis* em comparação com *T. mastichina*, o qual não apresentou timol nem carvacrol na sua constituição (PINA-VAZ et al, 2004).

As propriedades antimicrobianas e a composição química de óleos essenciais de *Thymus* e seus componentes majoritários foram determinadas. Três óleos essenciais obtidos de diferentes espécies de *Thymus* encontradas naturalmente na Sardenha e uma amostra comercial do óleo de *Thymus capitatus* foram analisadas. Os componentes dos óleos foram identificados por análises de CG-EM, revelando como constituintes majoritários monoterpenos e compostos fenólicos, porém com grandes variações entre os óleos examinados. A atividade antimicrobiana foi determinada contra diferentes microrganismos, incluindo *C. albicans*, através do método da microdiluição em caldo. Os óleos essenciais de *Thymus capitatus* comercial, *T. capitatus* e *T. herba-barona* 'a' evidenciaram CIM frente a *C. albicans* de 450 $\mu\text{g/mL}$, enquanto *T. herba-barona* 'b', apresentou CIM de 225 $\mu\text{g/mL}$. Dentre os compostos isolados testados, α -pineno, *p*-cimeno, γ -terpineno e linalol

demonstraram CIM >900 µg/mL; α-terpineol apresentou CIM de 225 µg/mL, enquanto timol e carvacrol evidenciaram CIM de 112,5 µg/mL. Este estudo confirmou que a atividade antimicrobiana dos óleos de tomilho é principalmente devida ao alto conteúdo de compostos fenólicos. De fato, *T. herba-barona* 'amostra b', caracterizada por maior conteúdo de fenóis do que os outros óleos analisados (67,5%), demonstrou atividade antimicrobiana superior frente às cepas testadas. Em adição, efeitos sinérgicos ou antagonistas entre alguns componentes podem também afetar a atividade antimicrobiana exercida pelos óleos essenciais (COSENTINO et al, 1999).

A composição química e a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Thymus mastichina*, *T. camphoratus* e *T. lotocephalus* de diferentes regiões de Portugal foram estudadas. As análises químicas foram efetuadas através de CG e CG-EM, e a atividade antimicrobiana, realizada através da técnica de difusão em ágar, frente a: *C. albicans*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* spp. e *S. aureus*. Os componentes majoritários encontrados nos óleos essenciais, dependendo da espécie ou lugar onde a planta foi coletada, incluíram linalol, 1,8-cineol e acetato de linalila. Em conclusão, os óleos essenciais isolados das espécies de *Thymus* estudadas demonstraram atividade antimicrobiana, embora as suscetibilidades tenham variado, significativamente, entre as diferentes espécies, indicando que o espectro de ação antimicrobiana dos óleos essenciais está intimamente relacionado aos seus constituintes (FALEIRO et al, 2002).

3.11.8 *Zingiber* sp. (Gengibre)

O gengibre possui diversas propriedades, entre elas estão as atividades antiinflamatória, antiemética, antimutagênica, antiulcerogênica, hipoglicêmica, antibacteriana, entre outras (YOSHIKAWA et al, 1994; UTPALENDU et al, 1999; VISHWAKARMA et al, 2002). A análise fitoquímica de rizomas de gengibre demonstrou a presença de 1% a 2,5% de óleo essencial, em cuja composição foram encontrados citral, cineol, borneol e os sesquiterpenos zingibereno e bisaboleno que são responsáveis pelo sabor forte e picante do gengibre. O óleo essencial responde pelo aroma e ação antimicrobiana, que só aparece no rizoma fresco (LORENZI &

MATOS, 2002). Popularmente, o gengibre vem sendo empregado por meio de soluções e *sprays*, na cavidade oral, devido a sua ação cicatrizante, antiinflamatória e antimicrobiana. É indicado, também, no tratamento de dores de cabeça, náusea e outras desordens estomacais, de resfriados e algumas outras infecções virais como a hepatite C, de osteoartrite, além de apresentar efeitos anticarcinogênicos (GRÉGIO et al, 2006).

A avaliação das propriedades antimicrobianas do extrato de *Zingiber officinale* foi realizada frente a microrganismos comumente encontrados na cavidade oral, tais como *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. Obteve-se CIM de 5 mg/mL para os extratos glicólico e hidroalcoólico de gengibre frente aos diferentes microrganismos analisados. Entretanto, o extrato etanólico e o óleo essencial de gengibre não apresentaram atividade antimicrobiana efetiva segundo as condições experimentais empregadas, uma vez que os componentes do gengibre são termolábeis, podendo ter perdido os seus efeitos antimicrobianos no momento da sua obtenção (GRÉGIO et al, 2006). De acordo com Chen et al (1985), os princípios ativos antimicrobianos de diversas plantas empregadas como temperos culinários são termolábeis. No caso específico do gengibre, os autores relataram reduzida atividade antimicrobiana após seu aquecimento. Da mesma forma, a discrepância observada entre pesquisas envolvendo a atividade antimicrobiana do óleo essencial de gengibre pode ser explicada pelas variações de sazonalidade, de geografia e biodiversidade que interferem nas propriedades farmacológicas do rizoma (DOUSSOT et al, 2002; TALLEY et al, 2002; TAVEIRA et al, 2003). Lopez et al (2005) analisaram a eficácia de seis óleos essenciais, incluindo o de gengibre frente a alguns microrganismos tais como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. A grande maioria dos óleos essenciais avaliados demonstrou atividade antimicrobiana, porém o óleo de gengibre apresentou resultado pouco favorável.

3.12 Ação de óleos essenciais sobre a formação de tubo germinativo

Manohar et al (2001) pesquisaram a ação do óleo essencial de orégano e do carvacrol sobre a formação de tubo germinativo, bem como frente à subsequente formação de micélio por *C. albicans*. Para o óleo de orégano, a CIM capaz de inibir a formação de tubo germinativo foi de 0,062 mg/ml (24 h) e a CFM (48 h) foi o dobro da CIM, 0,125 mg/ml. Carvacrol evidenciou CIM e CFM de 0,125 mg/mL. O óleo de orégano e o carvacrol também inibiram a formação de micélio de *C. albicans* a 0,125 mg/ml (CIM) e 0,125 mg/ml (CFM), e a 0,125 mg/ml (CIM) e 0,25 mg/ml (CFM), respectivamente.

A ação antifúngica do óleo essencial de *Lavandula angustifolia* e seus principais componentes, linalol e acetato de linalila, foi investigada contra cepas de *C. albicans* isoladas de candidíase vaginal e orofaríngea. O óleo essencial, assim como seus principais constituintes, inibiram a formação de tubo germinativo em concentrações menores que a CIM. Dessa forma, o óleo pode ser efetivo contra o dimorfismo de *C. albicans* e, conseqüentemente, reduzir a progressão fúngica e invasão da infecção no tecido do hospedeiro (D'AURIA et al, 2005).

Pina-Vaz et al (2004) avaliaram a ação dos óleos essenciais de *Thymus vulgaris*, *T. zygis* e *T. mastichina*, além dos seus constituintes majoritários, timol, carvacrol, 1,8-cineol e *p*-cimeno sobre a formação de tubo germinativo por *C. albicans*. Como resultado, observaram que concentrações abaixo dos valores da CIM inibiram significativamente a formação de tubo germinativo.

Salgueiro et al (2003b) pesquisaram as propriedades antifúngicas do óleo essencial de *Origanum virens* frente a *Candida* spp. O mesmo caracterizou-se pelo alto conteúdo de carvacrol (68,1 %) e seus precursores biogénéticos, γ -terpineno (9,9 %) e *p*-cimeno (4.5 %). Em conclusão, os valores de CIM e CFM foram similares para a maioria das cepas testadas, na faixa de 0,16 a 0,32 μ L/mL. Entretanto, concentrações menores do que os valores de CIM foram capazes de inibir a formação de tubo germinativo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismos

Os microrganismos utilizados no estudo foram isolados clínicos de candidíases orofaríngeas, pertencentes a micoteca do Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI), constituindo-se de 138 isolados. Estes foram distribuídos em 5 espécies, as quais foram agrupadas de acordo com a suscetibilidade ao fluconazol. No Quadro 1, pode-se observar os microrganismos pesquisados, os quais estão designados por “S”, quando sensíveis ao fluconazol, e “R”, quando resistentes; considera-se também, o fato de *C. glabrata* e *C. krusei* serem classificadas como intrinsecamente resistentes ao fluconazol.

Quadro 1 – Distribuição das espécies de *Candida* de acordo com a suscetibilidade ao fluconazol.

Microrganismos	n (número)
<i>C. albicans</i> (S)	30
<i>C. albicans</i> (R)	30
<i>C. dubliniensis</i> (S)	30
<i>C. dubliniensis</i> (R)	24
<i>C. glabrata</i> (R)	4
<i>C. krusei</i> (R)	4
<i>C. tropicalis</i> (S)	8
<i>C. tropicalis</i> (R)	8
Total	138

As amostras de *Candida dubliniensis* resistentes ao fluconazol foram obtidas *in vitro*, a partir de isolados sensíveis, pela técnica de indução de resistência conforme Fekete-Forgács et al (2000).

Embora previamente categorizadas como sensíveis ou resistentes, foram realizados testes de suscetibilidade ao fluconazol para confirmar a sensibilidade ou resistência para todos os isolados através da técnica de microdiluição em caldo, de acordo com as normas de padronização publicadas no documento M27-A2 do NCCLS (2002).

Os critérios de definição de suscetibilidade ao fluconazol foram aqueles sugeridos pelo NCCLS (2002): isolados sensíveis (CIM $\leq 8\mu\text{g/mL}$); isolados sensíveis-dose-dependente (CIM entre 16 e $32\mu\text{g/mL}$); isolados resistentes (CIM $\geq 64\mu\text{g/mL}$).

4.2 Óleos essenciais

No presente estudo, avaliou-se a atividade antifúngica de óleos essenciais obtidos de condimentos conforme a descrição no quadro abaixo.

Quadro 2 – 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.	Manjeriço
<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 sálvia e manjeriço foram obtidos a partir de materiais vegetais frescos e grosseiramente divididos, colhidos em março de 2005 na área experimental do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM (Santa Maria, RS, Brasil); o cultivo destas duas plantas foi realizado com sementes certificadas. O óleo essencial de gengibre foi obtido a partir de material vegetal fresco adquirido no comércio local, em março de 2005.

Para a extração dos óleos essenciais, foi utilizada a técnica de hidrodestilação, utilizando um aparelho tipo Clevenger modificado, conforme técnica descrita pela Farmacopéia Brasileira 4ª ed. (2000).

Os óleos essenciais de orégano, alecrim e tomilho foram adquiridos comercialmente da empresa Essential 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).

4.2.2 Análise dos constituintes químicos dos óleos essenciais

As análises qualitativa e semiquantitativa dos principais constituintes químicos dos óleos essenciais foram realizadas através de duas técnicas: cromatografia gasosa (CG), de onde se obteve os índices de retenção (Índices de Kovats) dos compostos, e cromatografia gasosa acoplada em espectrômetro de massas (CG-EM), a qual forneceu os espectros de massas da maioria dos constituintes dos óleos essenciais. Os compostos presentes em concentração inferior a 0,5% não foram considerados para fins de identificação.

O índice de retenção (IR), que relaciona o tempo de retenção dos compostos ao tempo de retenção de uma série de hidrocarbonetos homólogos, permite uma boa comparação com os valores encontrados na literatura. Para obtenção do IR, foi

empregada uma mistura de padrões de alcanos C8-C16, a qual foi injetada sob as mesmas condições de análises cromatográficas.

Para o cálculo do IR, utilizou-se a seguinte equação:

$$IR = 100 \left[\frac{t'_R(A) - t'_R(N) + N}{t'_R(N+n) - t'_R(N)} \right]$$

Onde: IR é o índice de retenção; $t'_R(A)$ é o tempo de retenção do composto desconhecido; $t'_R(N)$ e $t'_R(N+n)$ são os tempos de retenção dos hidrocarbonetos de números de átomos de carbono (N) e (N+n) que são respectivamente, menor e maior do que o tempo de retenção da amostra; e N é o número de carbonos do hidrocarboneto de tempo de retenção inferior ao do composto a ser identificado.

A técnica de CG foi efetuada em Cromatógrafo Gasoso Varian CP-3800 equipado com detector de ionização de chama (FID), injetor tipo splitless e coluna capilar de sílica fundida SE-54 de 25m de comprimento x 0,25mm de diâmetro interno; a temperatura do injetor utilizada foi de 220°C, enquanto a aplicada ao detector foi de 250°C; o gás de arraste foi o Hidrogênio (H₂), 7,0 psi; e a rampa de temperatura iniciou em 50°C, atingindo a temperatura final de 250°C numa velocidade de 4°C/min. A técnica de cromatografia gasosa, para obtenção do IR das principais substâncias presentes nos óleos, foi realizada em colaboração com o Professor Doutor Ademir F. Morel do Departamento de Química desta universidade.

Os espectros de massas dos compostos presentes nos óleos essenciais foram obtidos através de um Cromatógrafo Gasoso modelo Hewlett-Packard (HP) 6890 Series Plus+, equipado com injetor automático split-splitless modelo HP 6890 Series GCAutoSampler Controller e detector seletivo de massas modelo HP 5973 MSD. Foi utilizada coluna de sílica fundida HP-5 MS (30m de comprimento, 0.32mm de diâmetro interno e espessura do filme de 0,25µm) com 5% de fenil e 95% de metilsiloxano. O gás de arraste usado foi o Hélio (He) com 99,999% de pureza. O fluxo do gás He foi constante e de 2mL/min. A temperatura do injetor foi de 250°C. A temperatura inicial de programação do forno foi de 60°C por 1 min, após aquecendo 12°C/min até atingir 280°C, permanecendo nesta temperatura. A amostra (1µL) foi injetada no modo split, com razão 20/1. Os parâmetros do espectrômetro de massas foram os seguintes: linha de transferência a 290°C, a energia de ionização por impacto de elétrons foi de 70 eV; a temperatura da fonte foi de 230°C, a temperatura

do quadrupolo MS foi de 150°C, a voltagem do EM foi mantida 400V acima do autotune e/ou Quiktune e foi utilizado para a saída do solvente o tempo de 6,00 min. A técnica de CG-EM foi efetuada no Núcleo de Análises e Pesquisas Orgânicas (NAPO) da Universidade Federal de Santa Maria.

Os espectros de massas e os IRs obtidos foram comparados aos descritos na literatura (ADAMS, 2001).

4.3 Avaliação da atividade de óleos essenciais frente a *Candida spp.*

4.3.1 Técnica utilizada

Empregou-se a microdiluição em caldo, de acordo com o documento M27-A2 do NCCLS (2002), atualmente denominado CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). A metodologia foi adaptada substituindo-se os antifúngicos, descritos no documento M27-A2, pelos óleos essenciais. Os testes foram realizados em duplicata em dias diferentes, utilizando placas de microtitulação com 96 poços.

4.3.2 Diluição dos óleos essenciais

Inicialmente, os óleos essenciais foram solubilizados em metanol originando uma solução estoque na concentração de 640000µg/mL. A partir desta, realizou-se uma diluição 1:100 em 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.

4.3.3 Preparação dos inóculos

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 microrganismos 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 nº0,5 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, provocou uma diluição 1:2.

4.3.4 Inoculação nas placas de microtitulação

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, auxilia no controle da turbidez para a leitura das CIMs.

4.3.5 Incubação

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

4.3.6 Leitura dos testes

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

Foram adotados dois procedimentos para leitura das CIMs:

1º) Inibição parcial (CIM_P): corresponde a menor concentração capaz de inibir 50% do crescimento fúngico, quando comparado ao controle positivo.

2º) Inibição total (CIM_T): corresponde a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento fúngico.

As Figuras 1 e 2 exemplificam as leituras realizadas nos testes de microdiluição em caldo, utilizando-se os óleos essenciais de orégano e alecrim, respectivamente. Nas figuras, pode-se observar a presença dos controles negativos (coluna 8) e positivos (coluna 12). Em cada linha da placa de microtitulação, está presente um determinado isolado, assim como, cada coluna representa uma concentração diferente, a qual decresce no sentido da esquerda para a direita. Como exemplo, o óleo de orégano (Figura 1) evidencia forte atividade antifúngica frente a *Candida* spp, a qual pode ser comprovada através da observação de limpidez, ou seja, ausência de crescimento fúngico na maioria das concentrações testadas. Por outro lado, o óleo essencial de alecrim (Figura 2) não demonstrou atividade antifúngica, fato que pode ser evidenciado pela ausência de poços livres de crescimento fúngico, ou seja, presença de turvação em todos eles.

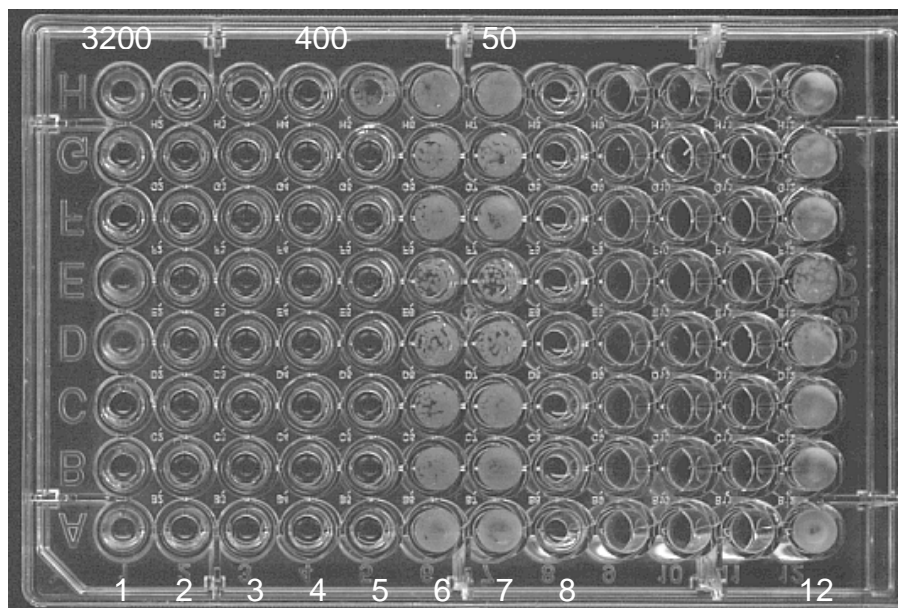


Figura 1 – Visualização da CIM do óleo essencial de orégano frente *Candida* spp através da microdiluição em caldo.

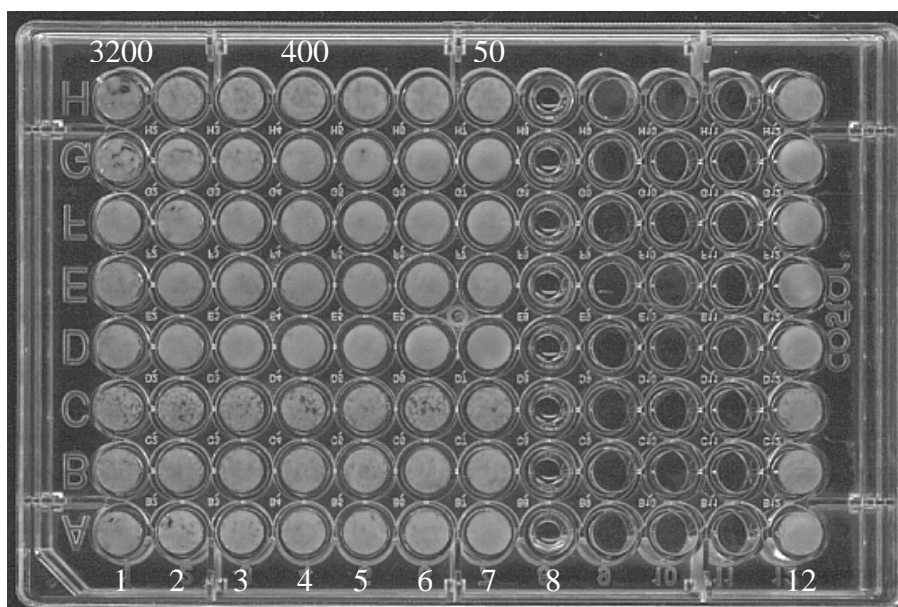


Figura 2 – Visualização da CIM do óleo essencial de alecrim frente *Candida* spp através da microdiluição em caldo.

4.3.7 Concentração fungicida mínima (CFM)

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

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

4.4 Inibição da emissão de tubo germinativo como prova de atividade antifúngica

No presente estudo, foi utilizada técnica semelhante à descrita por Schauder et al (1987), a qual utiliza um meio sintético denominado Meio Fase M para estimular a filamentação em *C. albicans* e *C. dubliniensis*.

O objetivo desta prova foi constatar a capacidade dos óleos essenciais de inibir a filamentação de *C. albicans* e *C. dubliniensis*. Para tanto, definiram-se 3 grupos de estudo, conforme descrito no Quadro 3, os quais estão designados por “S” quando sensíveis ao fluconazol, e “R”, quando resistentes, destacando-se que não foram testadas *C. dubliniensis* resistentes ao fluconazol devido ao fato das mesmas terem perdido a capacidade de formar tubo germinativo.

Quadro 3 – Microrganismos pesquisados

Grupo	Microrganismos	n (número)
1	<i>C. albicans</i> (S)	30
2	<i>C. albicans</i> (R)	30
3	<i>C. dubliniensis</i> (S)	30

4.4.1 Técnica de determinação da concentração inibitória mínima para tubos germinativos (CIMTG)

A solução estoque dos óleos essenciais na concentração de 640000 μ g/mL em metanol foi diluída a 1:100 no meio Fase M, resultando numa concentração de 6400 μ g/mL. A partir desta, foram realizadas diluições seriadas a 1:2, obtendo-se concentrações entre 50 μ g/mL e 3200 μ g/mL.

Uma alíquota de 100 μ L das diferentes concentrações do óleo essencial sob estudo foi dispensada em cada poço da placa de microtitulação e, a seguir, adicionou-se 100 μ L do inóculo padronizado. Este foi preparado no meio Fase M e ajustado conforme turvação semelhante ao tubo nº 0,5 da escala de McFarland. As placas foram incubadas em estufa a 37°C durante 3 h horas. Ao mesmo tempo, foram incluídos controles positivos, constituídos apenas do caldo Fase M e do inóculo, a fim de se comprovar a capacidade de emissão de tubo germinativo pelo isolado nas condições do ensaio.

Após as 3 horas de incubação, avaliou-se a formação ou não de tubos germinativos sob microscopia ótica, comparando-se com os controles positivos. Quando foi comprovada a capacidade do isolado de emitir tubos germinativos, realizou-se, então, uma avaliação semiquantitativa, contando quantas células filamentadas estavam presentes por campo microscópico (400x); dez campos foram contados, registrando-se os números mínimo e máximo de células filamentadas observados nas diferentes concentrações de óleo essencial. Essas provas foram realizadas em triplicata.

Determinou-se como CIMTG, a menor concentração de óleo essencial capaz de inibir a formação de tubo germinativo nas condições propostas pelo ensaio.

Na Figura 3 pode-se observar as seguintes imagens microscópicas: (1) falsos tubos germinativos, identificados pela existência de um ponto de constricção entre a célula leveduriforme e a pseudo-hifa; (2) tubo germinativo verdadeiro; (3) inibição da formação de tubos germinativos pelos óleos essenciais, evidenciando-se apenas células leveduriformes

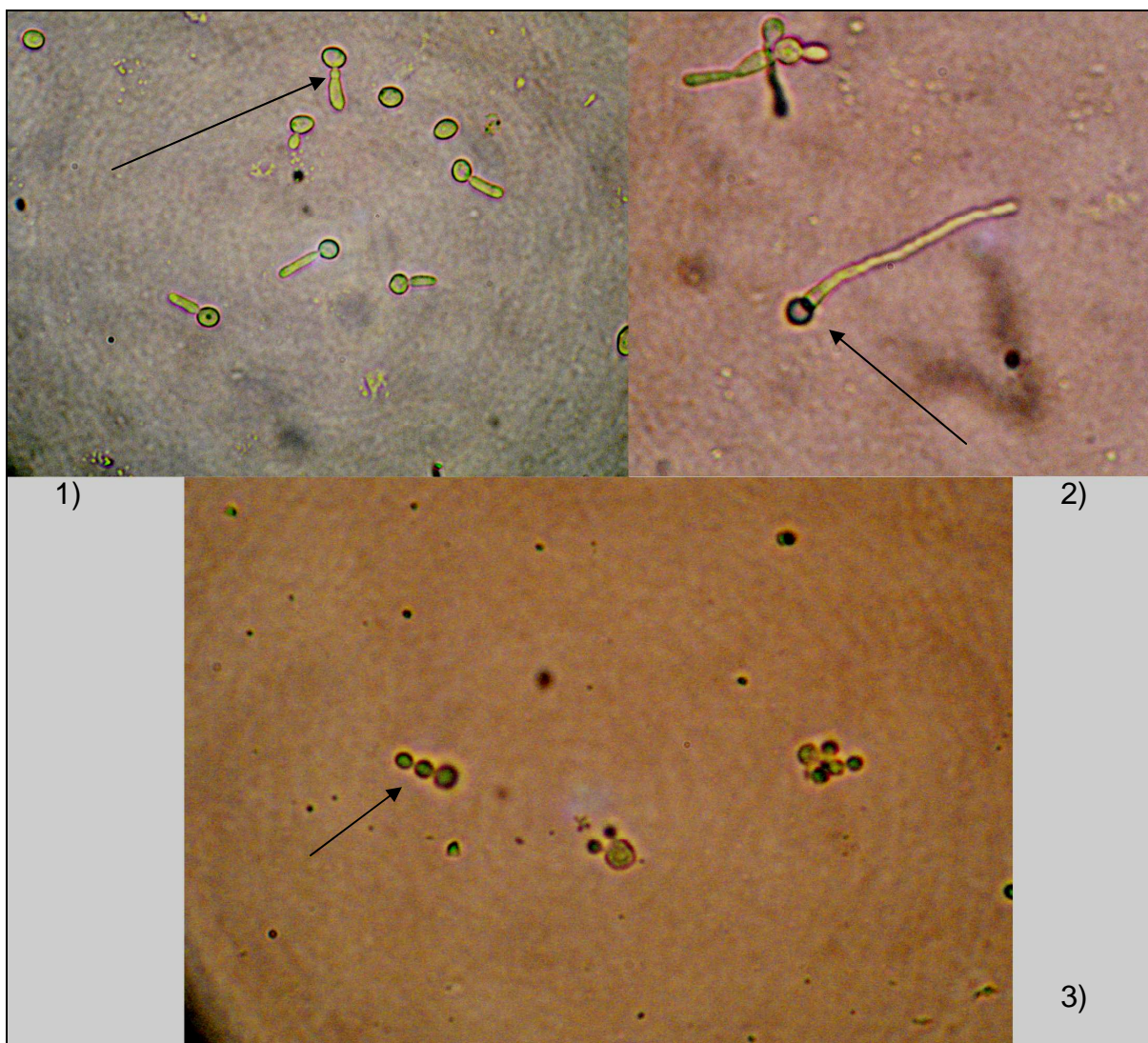


Figura 3 – Aspectos microscópicos de *Candida albicans* no meio Fase M (400x): 1) falsos tubos germinativos; 2) tubo germinativo verdadeiro; 3) atividade do óleo essencial inibindo a formação de tubos germinativos.

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.

Quando o valor encontrado foi $p \geq 0,05$, a diferença é não significativa, ou seja, não houve diferença estatística entre os grupos analisados. Se o valor foi de $p < 0,01$, verifica-se então diferença significativa referente a 1%. Quando o valor foi de $p < 0,05$, houve diferença significativa a 5%. O nível mínimo de significância indica a probabilidade de erro que se arrisca quando se rejeita H_0 , ou seja, quando se diz que há diferença entre as duas médias.

Quando a estatística calculada apresentou-se significativa com $p < 0,05$, usou-se um asterisco (*) para caracterizá-la; quando foi significativa a $p < 0,01$ usou-se dois asteriscos (**).

5 RESULTADOS

5.1 Perfil de suscetibilidade de leveduras patogênicas frente a óleos essenciais extraídos de condimentos

Os perfis de suscetibilidade dos 138 isolados de *Candida* spp, expressos como CIM_P, CIM_T e CFM (Tabelas 1 a 8), foram determinados frente aos óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum* (canela), *Lippia graveolens* (orégano mexicano), *Ocimum basilicum* (manjeriçã), *Origanum vulgare* (orégano), *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Salvia officinalis* (sálvia), *Thymus vulgaris* (tomilho) e *Zingiber officinale* (gengibre).

Com relação à atividade antifúngica dos óleos essenciais estudados, pôde-se observar que os óleos de *O. basilicum*, *R. officinalis* e *S. officinalis* (Tabelas 3, 5 e 6, respectivamente) não evidenciaram tal propriedade frente aos isolados de *Candida* spp nas concentrações testadas. Entretanto, os óleos essenciais de *C. zeylanicum*, *L. graveolens*, *O. vulgare*, *T. vulgaris* e *Z. officinale* (Tabelas 1, 2, 4, 7 e 8, respectivamente) demonstraram diferentes níveis de atividade antifúngica.

Os perfis de suscetibilidade das espécies de *Candida*, previamente classificadas como sensíveis (S) e resistentes (R) ao fluconazol, frente aos referidos óleos essenciais, foram comparados através do teste estatístico não paramétrico de Mann Whitney. Os valores de *p*, bem como os níveis de significância estão descritos nas Tabelas 1.1, 2.1, 4.1, 7.1 e 8.1.

5.1.1 Suscetibilidade de *Candida* spp, sensíveis e resistentes ao fluconazol, frente ao óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* (canela).

Com base nas CIMs, a faixa de suscetibilidade dos 138 isolados de *Candida* spp frente ao óleo de canela (Tabela 1) evidenciou variações de 200 µg/mL a 1600 µg/mL. Considerando CIM_P, *C. albicans* e *C. dubliniensis* (S) foram inibidas pela concentração de 200 µg/mL; entretanto, na maioria dos grupos estudados

foram detectados isolados requerendo 1600 µg/mL. Quando se consideram as médias aritméticas das CIM_P, o intervalo variou de 450 µg/mL a 1400 µg/mL. Para CIM_T, a menor concentração requerida foi 800 µg/mL, e a maior concentração de óleo essencial capaz de inibir todos os isolados foi 1600 µg/mL. Quanto às médias aritméticas, os intervalos variaram entre 800 µg/mL e 1600 µg/mL. Em relação a CFM, a menor concentração requerida foi 800 µg/mL, sendo observada em todos grupos, com exceção de *C. krusei* e *C. tropicalis* (R); já a maior concentração foi 3200 µg/mL para *C. glabrata*. Quanto às médias aritméticas, observaram-se variações entre 800 µg/mL e 1800 µg/mL, para *C. tropicalis* (S) e para *C. glabrata*, respectivamente.

As comparações dos perfis de suscetibilidade entre os diferentes grupos de *Candida*, frente ao óleo essencial de canela, foram avaliadas pelo teste estatístico de Mann Whitney (Tabela 1.2). As diferenças significativas encontradas nas análises realizadas foram: pela CIM_T, os isolados de *C. albicans* (S) demonstraram-se significativamente mais suscetíveis ao óleo de canela do que os de *C. albicans* (R) ($p=0,021^*$); pela CIM_P, *C. dubliniensis* (S) foram significativamente mais sensíveis ao óleo de canela do que *C. dubliniensis* (R) ($p<0,001^{**}$). Ao comparar *C. albicans* (S) e *C. dubliniensis* (S), esta foi significativamente mais sensível ao óleo de canela do que *C. albicans* (S) ($p<0,022^*$) pela CIM_P. De forma similar, quando foram comparados os isolados resistentes ao fluconazol, na CFM verificou-se diferenças significativas entre *C. albicans* (R) (CFM=1306,7µg/mL) e *C. dubliniensis* (R) (CFM=1066,7µg/mL) ($p=0,030^*$).

As comparações entre os grupos *C. albicans* versus *Candida* não-*albicans* (S), incluindo *C. dubliniensis*, evidenciaram diferenças significativas apenas no parâmetro CIM_P ($p=0,004^{**}$) frente ao óleo essencial de canela, sendo observadas médias aritméticas maiores para *C. albicans* do que para o grupo *Candida* não-*albicans*. Ao comparar *C. albicans* com o grupo de *Candida* não-*albicans*, excluindo-se *C. dubliniensis*, observaram-se diferenças significativas entre todos os parâmetros analisados, tanto nos grupos sensíveis quanto nos resistentes, com exceção de CIM_T para *Candida* (S). Para os isolados resistentes ao fluconazol, *Candida* não-*albicans* foram menos sensíveis do que *C. albicans* ao óleo de canela, fato contrário ao observado com os isolados sensíveis onde *Candida* não-*albicans* demonstraram-se mais sensíveis do que *C. albicans*.

Tabela 1 – Suscetibilidade *in vitro* de *Candida albicans* e espécies de *Candida não-albicans* frente ao óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum*.

Microorganismos	n	CIM _P (µg/mL)			CIM _T (µg/mL)			CFM (µg/mL)		
		Intervalo	Média	Intervalo	Média	Intervalo	Média	Intervalo	Média	
<i>C. albicans</i> - S*	30	200-1600	773,3	800-1600	1040,0	800-1600	1120,0			
<i>C. albicans</i> - R**	30	400-1600	866,7	800-1600	1280,0	800-1600	1306,7			
<i>C. dubliniensis</i> - S*	30	200-1600	593,3	800-1600	1013,3	800-1600	1093,3			
<i>C. dubliniensis</i> - R**	24	400-1600	950,0	800-1600	1066,7	800-1600	1066,7			
<i>C. glabrata</i> ***	4	400-1600	1100,0	800-1600	1400,0	800-3200	1800,0			
<i>C. krusei</i> ***	4	800-1600	1400,0	1600-1600	1600,0	1600-1600	1600,0			
<i>C. tropicalis</i> - S*	8	400-800	450,0	800-800	800,0	800-800	800,0			
<i>C. tropicalis</i> - R**	8	800-1600	1200,0	1600-1600	1600,0	1600-1600	1600,0			
Total	138									

* Cepas sensíveis ao fluconazol; ** Cepas resistentes ao fluconazol; *** As espécies de *C. glabrata* e *C. krusei* são intrinsecamente resistentes ao fluconazol; n= número de cepas testadas; CIM_P: Concentração inibitória mínima parcial; CIM_T: Concentração inibitória mínima total; CFM: Concentração fungicida mínima.

Tabela 1.1 – Valores de p e sua significância nas comparações entre a suscetibilidade (CIM_P, CIM_T, CFM) de espécies de *Candida* sensíveis e resistentes ao fluconazol, frente ao óleo essencial de *C. zeylanicum*.

Comparação	Suscetibilidade	Valores de p
<i>C. albicans</i> (S) x <i>C. albicans</i> (R)	CIM _P	0,330
	CIM _T	0,021*
	CFM	0,073
<i>C. dubliniensis</i> (S) x <i>C. dubliniensis</i> (R)	CIM _P	<0,001**
	CIM _T	0,597
	CFM	0,801
<i>C. albicans</i> (S) x <i>C. dubliniensis</i> (S)	CIM _P	0,022*
	CIM _T	0,776
	CFM	0,792
<i>C. albicans</i> (R) x <i>C. dubliniensis</i> (R)	CIM _P	0,441
	CIM _T	0,054
	CFM	0,030*
<i>C. albicans</i> (S) x <i>C. não-albicans</i> ^a (S)	CIM _P	0,004**
	CIM _T	0,401
	CFM	0,342
<i>C. albicans</i> (R) x <i>C. não-albicans</i> ^a (R)	CIM _P	0,064
	CIM _T	0,835
	CFM	0,724
<i>C. albicans</i> (S) x <i>C. não-albicans</i> ^b (S)	CIM _P	0,004**
	CIM _T	0,080
	CFM	0,033*
<i>C. albicans</i> (R) x <i>C. não-albicans</i> ^b (R)	CIM _P	0,009**
	CIM _T	0,017*
	CFM	0,015*

* significativo a $p < 0,05$; ** significativo a $p < 0,01$; Teste utilizado: Mann Whitney; a= *Candida* não-*albicans* incluindo *C. dubliniensis*; b= *Candida* não-*albicans* excluindo *C. dubliniensis*; S= espécies sensíveis ao fluconazol; R= espécies resistentes ao fluconazol.

5.1.2 Suscetibilidade de *Candida* spp, sensíveis e resistentes ao fluconazol, frente ao óleo essencial de *Lippia graveolens* (orégano mexicano).

A atividade antifúngica do óleo essencial de orégano mexicano, expressa em CIMs, frente aos 138 isolados de *Candida* spp, sensíveis e resistentes ao fluconazol, evidenciou variações de 50 µg/mL a 1600 µg/mL (Tabela 2). Considerando a CIM_P, observou-se o intervalo de 50 µg/mL a 800 µg/mL, e, quanto às médias aritméticas, obteve-se variações de 300 µg/mL, para *C. tropicalis* (R) e para *C. glabrata*, a

700 µg/mL para *C. krusei*. Ao analisar os valores de CIM_T, observou-se uma faixa de suscetibilidade de 200 µg/mL a 1600 µg/mL, e as médias aritméticas variaram de 500 µg/mL, para *C. glabrata*, a 800µg/mL para *C. tropicalis* (S) e *C. krusei*. Em relação as CFMs, as variações foram similares às observadas para CIM_T, e as médias variaram de 550 µg/mL a 1100 µg/mL.

A Tabela 2.1 demonstra os resultados da comparação entre os perfis de suscetibilidade dos diferentes grupos de *Candida* frente ao óleo essencial de *Lippia graveolens* obtidos pelo teste estatístico de Mann Whitney. Nos três parâmetros utilizados (CIM_P, CIM_T e CFM), *C. albicans* (S) foi significativamente mais resistente ao óleo de orégano mexicano do que *C. albicans* (R). Ao comparar *C. dubliniensis* (S) versus (R), somente pela CIM_P constatou-se que *C. dubliniensis* (S) foram significativamente mais sensíveis do que *C. dubliniensis* (R) ao óleo de orégano mexicano. Quando se comparou *C. albicans* (S) versus *C. dubliniensis* (S), apenas a CIM_T indicou que *C. dubliniensis* eram significativamente mais sensíveis do que *C. albicans* (S) (p=0,047*). Entretanto, nas comparações entre *C. albicans* (R) versus *C. dubliniensis* (R), todos os parâmetros evidenciaram que os isolados de *C. dubliniensis* (R) foram mais sensíveis ao óleo de orégano mexicano do que os de *C. albicans* (R).

Nas comparações entre *C. albicans* (S) versus *Candida* não-*albicans* (S), incluindo *C. dubliniensis*, nenhum dos parâmetros utilizados evidenciaram diferenças significativas quanto à suscetibilidade ao óleo de orégano mexicano. Todavia, nas comparações entre *C. albicans* (R) versus *Candida* não-*albicans* (R), todos os parâmetros detectaram diferenças significativas: *C. albicans* (R) foram mais sensíveis do que *Candida* não-*albicans* (R). Ao excluir *C. dubliniensis* (R) do grupo de *Candida* não-*albicans* (R), não foram observadas diferenças significativas entre os grupos comparados.

Tabela 2 – Suscetibilidade *in vitro* de *Candida albicans* e espécies de *Candida* não-*albicans* frente ao óleo essencial de *Lippia graveolens*.

Microorganismos	n	CIM _P (µg/mL)		CIM _T (µg/mL)		CFM (µg/mL)	
		Intervalo	Média	Intervalo	Média	Intervalo	Média
<i>C. albicans</i> - S*	30	50-800	541,7	400-800	733,3	400-800	746,7
<i>C. albicans</i> - R**	30	50-800	391,7	200-800	566,7	200-800	580,0
<i>C. dubliniensis</i> - S*	30	100-800	476,7	400-800	640,0	400-800	666,7
<i>C. dubliniensis</i> - R**	24	200-800	625,0	200-800	725,0	400-800	733,3
<i>C. glabrata</i> ***	4	200-400	300,0	400-800	500,0	400-800	600,0
<i>C. krusei</i> ***	4	400-800	700,0	800-800	800,0	800-800	800,0
<i>C. tropicalis</i> - S*	8	400-800	400,0	800-1600	800,0	800-1600	1100,0
<i>C. tropicalis</i> - R**	8	200-400	300,0	400-800	550,0	400-800	550,0
Total	138						

* Cepas sensíveis ao fluconazol; ** Cepas resistentes ao fluconazol; *** As espécies de *C. glabrata* e *C. krusei* são intrinsecamente resistentes ao fluconazol; n= número de cepas testadas; CIM_P: Concentração inibitória mínima parcial; CIM_T: Concentração inibitória mínima total; CFM: Concentração fungicida mínima.

Tabela 2.1 – Valores de p e sua significância nas comparações entre a suscetibilidade (CIM_P, CIM_T, CFM) de espécies de *Candida* sensíveis e resistentes ao fluconazol, frente ao óleo essencial de *L. graveolens*.

Comparação	Suscetibilidade	Valores de p
<i>C. albicans</i> (S) x <i>C. albicans</i> (R)	CIM _P	0,009**
	CIM _T	0,002**
	CFM	0,002**
<i>C. dubliniensis</i> (S) x <i>C. dubliniensis</i> (R)	CIM _P	0,031*
	CIM _T	0,087
	CFM	0,169
<i>C. albicans</i> (S) x <i>C. dubliniensis</i> (S)	CIM _P	0,217
	CIM _T	0,047*
	CFM	0,069
<i>C. albicans</i> (R) x <i>C. dubliniensis</i> (R)	CIM _P	0,001**
	CIM _T	0,008**
	CFM	0,009**
<i>C. albicans</i> (S) x <i>C. não-albicans</i> ^a (S)	CIM _P	0,107
	CIM _T	0,162
	CFM	0,567
<i>C. albicans</i> (R) x <i>C. não-albicans</i> ^a (R)	CIM _P	0,037*
	CIM _T	0,039*
	CFM	0,034*
<i>C. albicans</i> (S) x <i>C. não-albicans</i> ^b (S)	CIM _P	0,091
	CIM _T	0,492
	CFM	0,050
<i>C. albicans</i> (R) x <i>C. não-albicans</i> ^b (R)	CIM _P	0,787
	CIM _T	0,605
	CFM	0,508

* significativo a $p < 0,05$; ** significativo a $p < 0,01$; Teste utilizado: Mann Whitney; a= *Candida* não-*albicans* incluindo *C. dubliniensis*; b= *Candida* não-*albicans* excluindo *C. dubliniensis*. S= espécies sensíveis ao fluconazol; R= espécies resistentes ao fluconazol.

5.1.3 Suscetibilidade de *Candida* spp, sensíveis e resistentes ao fluconazol, frente ao óleo essencial de *Ocimum basilicum* (manjeriço).

Conforme demonstrado na Tabela 3, não foi detectada atividade antifúngica para o óleo essencial de manjeriço frente a *Candida* ssp nas concentrações testadas.

Tabela 3 – Suscetibilidade *in vitro* de *Candida albicans* e espécies de *Candida* não-*albicans* frente ao óleo essencial de *Ocimum basilicum*.

Microorganismos	n	CIM _P (µg/mL)			CIM _T (µg/mL)			CFM (µg/mL)		
		Intervalo	Média	Intervalo	Média	Intervalo	Média	Intervalo	Média	
<i>C. albicans</i> -S*	30	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	
<i>C. albicans</i> -R**	30	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	
<i>C. dubliniensis</i> -S*	30	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	
<i>C. dubliniensis</i> -R**	24	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	
<i>C. glabrata</i> ***	4	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	
<i>C. krusei</i> ***	4	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	
<i>C. tropicalis</i> -S*	8	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	
<i>C. tropicalis</i> -R**	8	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	
Total	138	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	

* Cepas sensíveis ao fluconazol; ** Cepas resistentes ao fluconazol; *** As espécies de *C. glabrata* e *C. krusei* são intrinsecamente resistentes ao fluconazol; n= número de cepas testadas; CIM_P: Concentração inibitória mínima parcial; CIM_T: Concentração inibitória mínima total; CFM: Concentração fungicida mínima.

5.1.4 Suscetibilidade de *Candida* spp, sensíveis e resistentes ao fluconazol, frente ao óleo essencial de *Origanum vulgare* (orégano).

Em geral, as CIMs de óleo essencial de orégano (Tabela 4) obtidas frente aos 138 isolados de *Candida* spp, sensíveis e resistentes ao fluconazol, evidenciaram variações de 50 µg/mL a 800 µg/mL. Ao considerar CIM_P, *C. albicans* (S) e (R) foram inibidas por concentrações tão baixas quanto 50 µg/mL; entretanto, *C. krusei* requereu CIM_P de 800 µg/mL. Quanto às médias aritméticas, observou-se variações de 200 µg/mL a 500 µg/mL. Para CIM_T, a menor concentração requerida foi 200 µg/mL, e, assim como na CIM_P, o valor máximo foi de 800 µg/mL. Considerando-se as médias aritméticas, foram evidenciadas variações entre 341,7 µg/mL e 800 µg/mL. Em relação as CFMs, os intervalos obtidos foram os mesmos para CIM_T, entretanto, quanto às médias aritméticas, observaram-se variações entre 386,7 µg/mL e 800 µg/mL.

A Tabela 4.1 demonstra os resultados obtidos pelo teste estatístico de Mann Whitney quando comparados os perfis de suscetibilidade entre os diferentes grupos de *Candida*, frente ao óleo essencial de orégano. Das comparações estabelecidas, foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas CIM_T, onde *C. dubliniensis* (S) foram mais resistentes do que *C. dubliniensis* (R) (p=0,029*). Ao excluir *C. dubliniensis* do grupo de *Candida* não-*albicans*, diferenças significativas foram detectadas nas comparações entre *C. albicans* (S) e (R) versus o grupo de *Candida* não-*albicans* (S) e (R), sendo que os isolados *Candida* não-*albicans* demonstraram-se mais resistentes do que *C. albicans* frente ao óleo de orégano.

Tabela 4 – Suscetibilidade *in vitro* de *Candida albicans* e espécies de *Candida não-albicans* frente ao óleo essencial de *Origanum vulgare*.

Microorganismos	n	CIM _P (µg/mL)			CIM _T (µg/mL)			CFM (µg/mL)		
		Intervalo	Média	Intervalo	Média	Intervalo	Média	Intervalo	Média	
<i>C. albicans</i> - S*	30	50-400	245,0	200-800	393,3	200-800	393,3	200-800	393,3	
<i>C. albicans</i> - R**	30	50-400	288,3	200-800	386,7	200-800	386,7	200-800	386,7	
<i>C. dubliniensis</i> - S*	30	100-400	243,3	200-400	386,7	200-800	400,0	200-800	400,0	
<i>C. dubliniensis</i> - R**	24	200-400	283,3	200-400	341,7	200-800	425,0	200-800	425,0	
<i>C. glabrata</i> ***	4	200-400	300,0	400-400	400,0	400-400	400,0	400-400	400,0	
<i>C. krusei</i> ***	4	400-800	500,0	800-800	800,0	800-800	800,0	800-800	800,0	
<i>C. tropicalis</i> - S*	8	200-400	250,0	400-800	500,0	400-800	600,0	400-800	600,0	
<i>C. tropicalis</i> - R**	8	200-200	200,0	400-400	400,0	400-400	400,0	400-400	400,0	
Total	138									

* Cepas sensíveis ao fluconazol; ** Cepas resistentes ao fluconazol; *** As espécies de *C. glabrata* e *C. krusei* são intrinsecamente resistentes ao fluconazol; n= número de cepas testadas; CIM_P: Concentração inibitória mínima parcial; CIM_T: Concentração inibitória mínima total; CFM: Concentração fungicida mínima.

Tabela 4.1 – Valores de p e sua significância nas comparações entre a suscetibilidade (CIM_P, CIM_T, CFM) de espécies de *Candida* sensíveis e resistentes ao fluconazol, frente ao óleo essencial de *O. vulgare*.

Comparação	Suscetibilidade	Valores de p
<i>C. albicans</i> (S) x <i>C. albicans</i> (R)	CIM _P	0,144
	CIM _T	0,524
	CFM	0,524
<i>C. dubliniensis</i> (S) x <i>C. dubliniensis</i> (R)	CIM _P	0,121
	CIM _T	0,029*
	CFM	0,778
<i>C. albicans</i> (S) x <i>C. dubliniensis</i> (S)	CIM _P	0,945
	CIM _T	0,977
	CFM	0,700
<i>C. albicans</i> (R) x <i>C. dubliniensis</i> (R)	CIM _P	0,826
	CIM _T	0,265
	CFM	0,340
<i>C. albicans</i> (S) x <i>C. não-albicans</i> ^a (S)	CIM _P	0,896
	CIM _T	0,426
	CFM	0,140
<i>C. albicans</i> (R) x <i>C. não-albicans</i> ^a (R)	CIM _P	0,774
	CIM _T	0,648
	CFM	0,059
<i>C. albicans</i> (S) x <i>C. não-albicans</i> ^b (S)	CIM _P	0,875
	CIM _T	0,221
	CFM	0,026*
<i>C. albicans</i> (R) x <i>C. não-albicans</i> ^b (R)	CIM _P	0,793
	CIM _T	0,016*
	CFM	0,016*

* significativo a $p < 0,05$; ** significativo a $p < 0,01$; Teste utilizado: Mann Whitney; a= *Candida* não-*albicans* incluindo *C. dubliniensis*; b= *Candida* não-*albicans* excluindo *C. dubliniensis*. S= espécies sensíveis ao fluconazol; R= espécies resistentes ao fluconazol.

5.1.5 Suscetibilidade de *Candida* spp, sensíveis e resistentes ao fluconazol, frente ao óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* (alecrim).

Conforme demonstrado na Tabela 5, o óleo essencial de alecrim não evidenciou atividade antifúngica frente aos diferentes grupos de *Candida* ssp. estudados no presente trabalho.

Tabela 5 – Suscetibilidade *in vitro* de *Candida albicans* e espécies de *Candida* não-*albicans* frente ao óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*

Microorganismos	n	CIM _P (µg/mL)			CIM _T (µg/mL)			CFM (µg/mL)		
		Intervalo	Média	Intervalo	Média	Intervalo	Média	Intervalo	Média	
<i>C. albicans</i> -S*	30	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	
<i>C. albicans</i> -R**	30	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	
<i>C. dubliniensis</i> -S*	30	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	
<i>C. dubliniensis</i> -R**	24	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	
<i>C. glabrata</i> ***	4	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	
<i>C. krusei</i> ***	4	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	
<i>C. tropicalis</i> -S*	8	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	
<i>C. tropicalis</i> -R**	8	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	
Total	138	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	

* Cepas sensíveis ao fluconazol; ** Cepas resistentes ao fluconazol; *** As espécies de *C. glabrata* e *C. krusei* são intrinsecamente resistentes ao fluconazol; n= número de cepas testadas; CIM_P: Concentração inibitória mínima parcial; CIM_T: Concentração inibitória mínima total; CFM: Concentração fungicida mínima.

5.1.6 Suscetibilidade de *Candida* spp, sensíveis e resistentes ao fluconazol, frente ao óleo essencial de *Salvia officinalis* (sálvia).

Conforme demonstrado na Tabela 6, não foi detectada atividade antifúngica para o óleo essencial de sálvia frente a *Candida* spp nas concentrações testadas.

Tabela 6 – Suscetibilidade *in vitro* de *Candida albicans* e espécies de *Candida não-albicans* frente ao óleo essencial de *Salvia officinalis*

Microorganismos	n	CIM _P (µg/mL)			CIM _T (µg/mL)			CFM (µg/mL)		
		Intervalo	Média	Intervalo	Média	Intervalo	Média	Intervalo	Média	
<i>C. albicans</i> -S*	30	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	
<i>C. albicans</i> -R**	30	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	
<i>C. dubliniensis</i> -S*	30	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	
<i>C. dubliniensis</i> -R**	24	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	
<i>C. glabrata</i> ***	4	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	
<i>C. krusei</i> ***	4	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	
<i>C. tropicalis</i> -S*	8	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	
<i>C. tropicalis</i> -R**	8	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	
Total	138	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200	

* Cepas sensíveis ao fluconazol; ** Cepas resistentes ao fluconazol; *** As espécies de *C. glabrata* e *C. krusei* são intrinsecamente resistentes ao fluconazol; n= número de cepas testadas; CIM_P: Concentração inibitória mínima parcial; CIM_T: Concentração inibitória mínima total; CFM: Concentração fungicida mínima.

5.1.7 Suscetibilidade de *Candida* spp, sensíveis e resistentes ao fluconazol, frente ao óleo essencial de *Thymus vulgaris* (tomilho).

Com base nas CIMs, a faixa de suscetibilidade dos 138 isolados de *Candida* spp ao óleo de tomilho evidenciou variações de 200 µg/mL a 3200 µg/mL (Tabela 7). Considerando CIM_P, *C. dubliniensis* (S) requereram a menor concentração para serem inibidas (50 µg/mL), enquanto que a CIM_P capaz de inibir 100% dos isolados foi 1600 µg/mL. Quanto às médias, observaram-se variações entre 456,7 µg/mL e 1600 µg/mL. Para CIM_T, a menor concentração inibitória foi 400 µg/mL, a qual inibiu *C. dubliniensis* (S); já, a concentração de 3200 µg/mL, foi capaz de inibir 100% dos isolados. Quanto às médias, foram evidenciadas variações entre 933,3 µg/mL e 2800 µg/mL. Em relação as CFMs, os intervalos obtidos foram similares aos de CIM_T, e quanto às médias aritméticas, observaram-se variações entre 946,7 µg/mL e 2800µg/mL.

A Tabela 7.1 demonstra os resultados obtidos da comparação entre os perfis de suscetibilidade dos diferentes grupos de *Candida*, frente ao óleo essencial de tomilho, através do teste de Mann Whitney. Ao comparar *C. albicans* (S) versus *C. albicans* (R), a CIM_T detectou que a primeira foi significativamente mais sensível ao óleo essencial de tomilho do que a segunda ($p= 0,026^*$). Quando foram comparados os isolados de *C. dubliniensis*, todos os parâmetros de suscetibilidade (CIM_P, CIM_T e CFM) detectaram que *C. dubliniensis* (S) foram significativamente mais sensíveis do que *C. dubliniensis* (R) frente ao óleo de tomilho. Da mesma forma, pelos três parâmetros, *C. dubliniensis* (S) foi significativamente mais sensível do que *C. albicans* (S) ($p<0,01^{**}$); mas quando se comparou *C. albicans* (R) e *C. dubliniensis* (R), não foram detectadas diferenças significativas. Os três parâmetros também detectaram que *C. albicans* (S) foi significativamente mais resistente do que *Candida* não-*albicans* (incluindo *C. dubliniensis*) (S) ($p<0,001^{**}$). Por outro lado, ao excluir *C. dubliniensis* do grupo de *Candida* não-*albicans*, pôde-se verificar através da CIM_T ($p=0,007^{**}$) e da CFM ($p=0,018^*$), que *C. albicans* (R) foram significativamente mais suscetíveis do que *Candida* não-*albicans* (R).

Tabela 7 – Suscetibilidade *in vitro* de *Candida albicans* e espécies de *Candida* não-*albicans* frente ao óleo essencial de *Thymus vulgaris*.

Microrganismos	n	CIM _P (µg/mL)			CIM _T (µg/mL)			CFM (µg/mL)		
		Intervalo	Média	Intervalo	Média	Intervalo	Média	Intervalo	Média	
<i>C. albicans</i> - S*	30	200-1600	1086,7	800-3200	1600,0	800-3200	1600,0	800-3200	1653,3	
<i>C. albicans</i> - R**	30	800-1600	1066,7	800-1600	1386,0	800-3200	1386,0	800-3200	1600,0	
<i>C. dubliniensis</i> - S*	30	50-800	456,7	400-1600	933,3	400-1600	933,3	400-1600	946,7	
<i>C. dubliniensis</i> - R**	24	800-1600	966,7	800-1600	1333,3	800-3200	1333,3	800-3200	1600,0	
<i>C. glabrata</i> ***	4	200-1600	950,0	800-1600	1400,0	1600-1600	1400,0	1600-1600	1600,0	
<i>C. krusei</i> ***	4	1600-1600	1600,0	1600-3200	2800,0	1600-3200	2800,0	1600-3200	2800,0	
<i>C. tropicalis</i> - S*	8	400-800	750,0	800-1600	1300,0	800-1600	1300,0	800-1600	1300,0	
<i>C. tropicalis</i> - R**	8	800-1600	1000,0	1600-3200	1800,0	1600-3200	1800,0	1600-3200	1800,0	
Total	138									

* Cepas sensíveis ao fluconazol; ** Cepas resistentes ao fluconazol; *** As espécies de *C. glabrata* e *C. krusei* são intrinsecamente resistentes ao fluconazol; n= número de cepas testadas; CIM_P: Concentração inibitória mínima parcial; CIM_T: Concentração inibitória mínima total; CFM: Concentração fungicida mínima.

Tabela 7.1 – Valores de p e sua significância nas comparações entre a suscetibilidade (CIM_P, CIM_T, CFM) de espécies de *Candida* sensíveis e resistentes ao fluconazol, frente ao óleo essencial de *T. vulgaris*.

Comparação	Suscetibilidade	Valores de p
<i>C. albicans</i> (S) x <i>C. albicans</i> (R)	CIM _P	0,863
	CIM _T	0,026*
	CFM	0,710
<i>C. dubliniensis</i> (S) x <i>C. dubliniensis</i> (R)	CIM _P	<0,001**
	CIM _T	0,001**
	CFM	<0,001**
<i>C. albicans</i> (S) x <i>C. dubliniensis</i> (S)	CIM _P	<0,001**
	CIM _T	<0,001**
	CFM	<0,001**
<i>C. albicans</i> (R) x <i>C. dubliniensis</i> (R)	CIM _P	0,313
	CIM _T	0,597
	CFM	0,428
<i>C. albicans</i> (S) x <i>C. não-albicans</i> ^a (S)	CIM _P	<0,001**
	CIM _T	<0,001**
	CFM	<0,001**
<i>C. albicans</i> (R) x <i>C. não-albicans</i> ^a (R)	CIM _P	0,723
	CIM _T	0,307
	CFM	0,616
<i>C. albicans</i> (S) x <i>C. não-albicans</i> ^b (S)	CIM _P	0,064
	CIM _T	0,160
	CFM	0,140*
<i>C. albicans</i> (R) x <i>C. não-albicans</i> ^b (R)	CIM _P	0,597
	CIM _T	0,007**
	CFM	0,018*

* significativo a $p < 0,05$; ** significativo a $p < 0,01$; Teste utilizado: Mann Whitney; a= *Candida* não-*albicans* incluindo *C. dubliniensis*; b= *Candida* não-*albicans* excluindo *C. dubliniensis*. S= espécies sensíveis ao fluconazol; R= espécies resistentes ao fluconazol.

5.1.8 Suscetibilidade de *Candida* spp, sensíveis e resistentes ao fluconazol, frente ao óleo essencial de *Zingiber* sp. (gengibre).

Com base nas CIMs, a faixa de suscetibilidade dos 138 isolados de *Candida* spp frente ao óleo essencial de gengibre evidenciou variações de 400 µg/mL a >3200 µg/mL (Tabela 8). Considerando CIM_P, isolados de *C. glabrata* requereram a menor concentração para serem inibidos (400 µg/mL); entretanto, alguns isolados não foram inibidos nas concentrações testadas (>3200 µg/mL). Quanto às médias

aritméticas, foram detectadas variações entre 1233,3 µg/mL e >3200 µg/mL. Para CIM_T , a menor concentração inibitória foi 800µg/mL, a qual inibiu *C. dubliniensis* (R); todavia, similarmente ao observado na CIM_p , muitos isolados não foram sensíveis ao óleo nas concentrações analisadas. E, quanto às médias aritméticas, evidenciaram-se variações entre 1982,6 µg/mL e >3200 µg/mL. Em relação as CFMs, os intervalos obtidos foram entre 1600 µg/mL e >3200 µg/mL, sendo que as médias aritméticas variaram de 2295,7 µg/mL a >3200 µg/mL.

As comparações dos perfis de suscetibilidade entre os diferentes grupos de *Candida*, frente ao óleo essencial de gengibre, foram avaliadas pelo teste de Mann Whitney (Tabela 8.1). Ao comparar os subgrupos (S) versus (R) de *C. dubliniensis*, os parâmetros CIM_T e CFM indicaram que *C. dubliniensis* (R) foram mais sensíveis ao óleo de gengibre do que *C. dubliniensis* (S) ($p < 0,001^{**}$). Quando se comparou *C. albicans* (R) versus *C. dubliniensis* (R), os três parâmetros indicaram que *C. albicans* foram mais resistentes do que *C. dubliniensis*. As comparações entre *C. albicans* (R) versus *Candida* não-*albicans* (R) (incluindo-se *C. dubliniensis*) também, nos três parâmetros, indicaram que *C. albicans* (R) foram mais resistentes do que *Candida* não-*albicans* (R) ($p < 0,007^{**}$). Excluindo-se *C. dubliniensis* do grupo *Candida* não-*albicans*, as comparações entre (S) e (R) não revelaram diferenças significativas.

Tabela 8 – Suscetibilidade *in vitro* de *Candida albicans* e espécies de *Candida* não-*albicans* frente ao óleo essencial de *Zingiber* sp.

Microorganismos	n	CIM _P (µg/mL)			CIM _T (µg/mL)			CFM (µg/mL)		
		Intervalo	Média	Intervalo	Intervalo	Média	Intervalo	Média	Intervalo	Média
<i>C. albicans</i> - S*	30	800->3200	2888,9	1600->3200	1600->3200	3100,0	1600->3200	3100,0	1600->3200	3100,0
<i>C. albicans</i> - R**	30	1600->3200	2800,0	1600->3200	1600->3200	3066,7	3200->3200	3200,0	3200->3200	3200,0
<i>C. dubliniensis</i> - S*	30	800-3200	1466,7	1600-3200	1600-3200	2880,0	1600->3200	3034,9	1600->3200	3034,9
<i>C. dubliniensis</i> - R**	24	800-1600	1233,3	800->3200	800->3200	1982,6	1600->3200	2295,65	1600->3200	2295,65
<i>C. glabrata</i> ***	4	400-3200	1500,0	3200-3200	3200-3200	3200,0	3200-3200	3200,0	3200-3200	3200,0
<i>C. krusei</i> ***	4	3200->3200	>3200,0	>3200->3200	>3200->3200	>3200,0	>3200->3200	>3200,0	>3200->3200	>3200,0
<i>C. tropicalis</i> - S*	8	>3200->3200	>3200,0	>3200->3200	>3200->3200	>3200,0	>3200->3200	>3200,0	>3200->3200	>3200,0
<i>C. tropicalis</i> - R**	8	>3200->3200	>3200,0	>3200->3200	>3200->3200	>3200,0	>3200->3200	>3200,0	>3200->3200	>3200,0
Total	138									

* Cepas sensíveis ao fluconazol; ** Cepas resistentes ao fluconazol; *** As espécies de *C. glabrata* e *C. krusei* são intrinsecamente resistentes ao fluconazol; n= número de cepas testadas; CIM_P: Concentração inibitória mínima parcial; CIM_T: Concentração inibitória mínima total; CFM: Concentração fungicida mínima.

Tabela 8.1 – Valores de p e sua significância nas comparações entre a suscetibilidade (CIM_P, CIM_T, CFM) de espécies de *Candida* sensíveis e resistentes ao fluconazol, frente ao óleo essencial de *Zingiber* sp.

Comparação	Suscetibilidade	Valores de p
<i>C. albicans</i> (S) x <i>C. albicans</i> (R)	CIM _P	0,606
	CIM _T	0,835
	CFM	0,398
<i>C. dubliniensis</i> (S) x <i>C. dubliniensis</i> (R)	CIM _P	0,326
	CIM _T	<0,001**
	CFM	<0,001**
<i>C. albicans</i> (S) x <i>C. dubliniensis</i> (S)	CIM _P	<0,001**
	CIM _T	0,221
	CFM	0,738
<i>C. albicans</i> (R) x <i>C. dubliniensis</i> (R)	CIM _P	<0,001**
	CIM _T	0,001**
	CFM	0,003**
<i>C. albicans</i> (S) x <i>C. não-albicans</i> (S)	CIM _P	<0,001**
	CIM _T	0,221
	CFM	0,738
<i>C. albicans</i> (R) x <i>C. não-albicans</i> (R)	CIM _P	<0,001**
	CIM _T	0,004**
	CFM	0,007**
<i>C. albicans</i> (S) x <i>C. não-albicans</i> ^b (S)	CIM _P	nd
	CIM _T	nd
	CFM	nd
<i>C. albicans</i> (R) x <i>C. não-albicans</i> ^b (R)	CIM _P	0,469
	CIM _T	0,862
	CFM	1,000

* significativo a $p < 0,05$; ** significativo a $p < 0,01$; Teste utilizado: Mann Whitney; a= *Candida* não-*albicans* incluindo *C. dubliniensis*; b= *Candida* não-*albicans* excluindo *C. dubliniensis*; nd= não definida (concentração inibitória >3200µg/mL); S= espécies sensíveis ao fluconazol; R= espécies resistentes ao fluconazol.

5.2 Valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ dos óleos essenciais extraídos de condimentos frente a espécies de *Candida* sensíveis e resistentes ao fluconazol.

Com base no percentual cumulativo de isolados inibidos em determinada concentração de óleo essencial, foram detectados os valores de CIM₅₀ e CIM₉₀, ou seja, concentração de óleo essencial capaz de inibir o crescimento de 50% e 90% dos isolados, respectivamente. Os valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ dos óleos essenciais frente a isolados de *Candida* spp, encontram-se relacionados na Tabela 9.

Considerando as CIM₅₀ e CIM₉₀, de modo geral, o óleo essencial de orégano demonstrou os menores valores frente a todos os isolados, seguido pelo orégano mexicano, canela, tomilho e pelo gengibre, o qual apresentou a menor atividade antifúngica, além de demonstrar-se inativo frente a alguns isolados nas concentrações testadas. Quanto ao óleo de canela, as CIM₅₀ e CIM₉₀ variaram de 800 µg/mL a 1600 µg/mL, enquanto que o óleo de orégano mexicano evidenciou CIM₅₀ entre 400 µg/mL e 800 µg/mL, não sendo observadas variações no CIM₉₀, que foi 800 µg/mL. Quanto ao óleo de orégano, a CIM₅₀ foi 400 µg/mL, com exceção de *C. krusei* que requereu 800µg/mL; os valores de CIM₉₀ foram similares aos de CIM₅₀ (400 µg/mL), excetuando-se *C. krusei* e *C. tropicalis* (S) que requereram concentrações de óleo superiores para serem inibidas (800 µg/mL). O óleo essencial de tomilho evidenciou CIM₅₀ entre 800 µg/mL, para *C. dubliniensis* (S), e 3200 µg/mL para *C. krusei*; já a CIM₉₀ foi superior, variando de 1600µg/mL a 3200µg/mL. Por fim, o óleo de gengibre evidenciou CIM₅₀ no intervalo de 1600 µg/mL a >3200 µg/mL, e CIM₉₀ entre 3200 µg/mL e >3200 µg/mL.

Tabela 9 – Análise dos valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ dos óleos essenciais extraídos de condimentos, frente aos isolados de *Candida* sensíveis e resistentes ao fluconazol.

Espécie	CIM	Canela	Orégano	Orégano mexicano	Tomilho	Gengibre
<i>C. albicans</i> S (n=30)	CIM ₅₀	800	800	400	1600	3200
	CIM ₉₀	1600	800	400	1600	>3200
<i>C. albicans</i> R (n=30)	CIM ₅₀	800	400	400	1600	>3200
	CIM ₉₀	1600	800	400	1600	>3200
<i>C. dubliniensis</i> S (n=30)	CIM ₅₀	800	800	400	800	3200
	CIM ₉₀	1600	800	400	1600	3200
<i>C. dubliniensis</i> R (n=24)	CIM ₅₀	800	800	400	1600	1600
	CIM ₉₀	1600	800	400	1600	3200
<i>C. glabrata</i> (n=4)	CIM ₅₀	1600	800	400	1600	3200
	CIM ₉₀	1600	800	400	1600	3200
<i>C. krusei</i> (n=4)	CIM ₅₀	1600	800	800	3200	>3200
	CIM ₉₀	1600	800	800	3200	>3200
<i>C. tropicalis</i> S (n=8)	CIM ₅₀	800	800	400	1600	>3200
	CIM ₉₀	800	800	800	1600	>3200
<i>C. tropicalis</i> R (n=8)	CIM ₅₀	1600	400	400	1600	>3200
	CIM ₉₀	1600	800	400	3200	>3200

Concentração em µg/mL; S= espécies resistentes ao fluconazol; R= espécies sensíveis ao fluconazol; n= número de amostras.

5.3 Suscetibilidade de *C. albicans* e *C. dubliniensis*, sensíveis e resistentes ao fluconazol, frente a óleos essenciais extraídos de condimentos, com base na inibição de tubos germinativos.

Realizou-se a determinação da menor concentração de óleo essencial capaz de inibir a formação de tubo germinativo de 90 isolados de *Candida* spp, incluindo as

duas espécies que possuem a propriedade de filamentação em soro, *C. albicans* e *C. dubliniensis* sensíveis e resistentes ao fluconazol. Os isolados de *C. dubliniensis* resistentes não foram incluídos no ensaio devido à incapacidade de formação de tubo germinativo por parte dos mesmos.

Os ensaios foram realizados de forma semiquantitativa, avaliando-se o número de células emitindo tubos germinativos presentes por campo microscópico (400x). Os valores de concentração inibitória mínima de tubo germinativo (CIMTG) dos óleos essenciais de *C. zeylanicum*, *L. graveolens*, *O. basilicum*, *O. vulgare*, *R. officinalis*, *S. officinalis*, *T. vulgaris* e *Zingiber* sp. frente aos 90 isolados de *Candida* spp estão dispostos na Tabela 10.

Com base na capacidade dos óleos essenciais de inibir a formação de tubos germinativos (Tabela 10), pôde-se observar, para *C. albicans* (S) e (R), bem como para *C. dubliniensis* (S), variações de 50 µg/mL a >3200 µg/mL, para os óleos de orégano e alecrim, respectivamente. Da mesma forma, em relação às médias aritméticas, as menores CIMTGs foram obtidas pelo óleo de orégano, enquanto que as maiores concentrações requeridas para inibir tubos germinativos foram evidenciadas pelo óleo essencial de alecrim. Considerando-se todos os óleos estudados, detectaram-se médias aritméticas variando entre 66,07 µg/mL e 2438,1 µg/mL, e entre 112 µg/mL e 2933,3 µg/mL para *C. albicans* (S) e (R), respectivamente. Para os isolados de *C. dubliniensis*, as médias variaram de 125,9 µg/mL a 2466,7 µg/mL.

As comparações entre as CIMTGs obtidas para as diferentes espécies, sensíveis e resistentes ao fluconazol, foram avaliadas através do teste estatístico de Mann Whitney (Tabela 10.1). Quando foram comparadas as CIMTGs referentes aos isolados de *C. albicans* (S) com os de *C. albicans* (R), constatou-se que *C. albicans* (S) foram significativamente mais sensíveis à inibição do que *C. albicans* (R), frente aos óleos de canela ($p=0,005^{**}$), orégano ($p=0,021^{*}$) e alecrim ($p=0,041^{*}$). Quando se comparou a suscetibilidade *C. albicans* (S) versus *C. dubliniensis* (S), com base na CIMTG, diferenças significativas só foram observadas frente ao óleo essencial de orégano, onde *C. albicans* (S) foi mais sensível do que *C. dubliniensis* (S) ($p<0,001^{**}$).

Tabela 10 – Concentração inibitória mínima de óleo essencial para inibição dos tubos germinativos de *C. albicans* e *C. dubliniensis* sensíveis e resistentes ao fluconazol.

Isolados	<i>C. albicans</i> -S (n=30)		<i>C. albicans</i> -R (n=30)		<i>C. dubliniensis</i> -S (n=30)	
	Óleos essenciais		Óleos essenciais		Óleos essenciais	
	CIMTG (µg/mL)		CIMTG (µg/mL)		CIMTG (µg/mL)	
	Intervalo	Média	Intervalo	Média	Intervalo	Média
<i>C. zeylanicum</i>	400-800	600,0	400-800	744,8	400-800	637,0
<i>L. graveolens</i>	100-200	175,0	100-400	210,3	50-400	183,3
<i>O. basilicum</i>	800-1600	1057,1	800-3200	1324,1	400-1600	1081,5
<i>O. vulgare</i>	50-200	66,07	50-200	112,0	50-200	125,9
<i>R. officinalis</i>	1600->3200	2438,1	1600->3200	2933,3	1600->3200	2466,7
<i>S. officinalis</i>	800-3200	1600,0	800-3200	2068,6	800-3200	1777,8
<i>T. vulgaris</i>	200-800	448,3	200-400	350,0	200-800	370,4
<i>Zingiber</i> sp.	400-1600	657,1	400-1600	800,0	400-800	681,5

S= espécies sensíveis ao fluconazol; R= espécies resistentes ao fluconazol; n= número de isolados testados; CIMTG: concentração inibitória mínima para inibição de tubo germinativo.

Tabela 10.1 - Valores de p obtidos nas comparações entre as CIMs de óleos essenciais requeridas para inibição de tubos germinativos de *C. albicans* e *C. dubliniensis*, sensíveis e resistentes ao fluconazol.

Óleo	Valores de p	
	<i>C. albicans</i> ^S x <i>C. albicans</i> ^R	<i>C. albicans</i> ^S x <i>C. dubliniensis</i> ^R
<i>C. zeylanicum</i>	0,005**	0,505
<i>L. graveolens</i>	0,439	0,702
<i>O. basilicum</i>	0,099	0,840
<i>O. vulgare</i>	0,021*	0,001**
<i>R. officinalis</i>	0,041*	0,911
<i>S. officinalis</i>	0,053	0,208
<i>T. vulgaris</i>	0,153	0,677
<i>Zingiber</i> sp.	0,115	0,208

* significativo a $p < 0,05$; ** significativo a $p < 0,01$; Teste utilizado: Mann Whitney; S= espécies sensíveis ao fluconazol; R= espécies resistentes ao fluconazol.

5.4 Composição química dos óleos essenciais

As análises químicas dos óleos essenciais foram realizadas através das técnicas de CG e CG-EM (Tabela 11), e a identificação dos compostos foi efetuada através da comparação dos resultados obtidos no índice de retenção (Índice de Kovats) e espectros de massas com dados da literatura (Adams, 2001). Cabe destacar, que apenas os compostos presentes em quantidades superiores a 0,5% na amostra foram identificados nas análises, e que o cálculo da porcentagem obtida para cada elemento baseou-se na área do pico referente ao mesmo. Em resumo, as análises realizadas tiveram caráter qualitativo e semiquantitativo.

Os constituintes majoritários presentes nos óleos essenciais foram: Z-isoeugenol (93,3%) para a canela; carvacrol (56,8%) e o-cimeno (32,2%) para orégano mexicano; linalol (32,22%) e 1,8-cineol (23,61%) para o manjeriço; carvacrol (92,6%) para o orégano; 1,8-cineol (28,59%) e cânfora (26,31%) para o alecrim; cis-tujona (40,61%) para a sálvia; γ -terpineno (64%) para o tomilho; e zingibereno (20,81%) para o óleo essencial de gengibre.

No Anexo 2, encontram-se os cromatogramas dos óleos essenciais e os espectros de massas dos seus constituintes majoritários.

Tabela 11 – Composição química dos óleos essenciais.

Composto	IR	Concentração (%)							
		Cz	Lg	Ob	Ov	Ro	So	Tv	Zsp.
α -tujeno	930		1,10						1,95
α -pineno	939			1,13		19,81	4,82	1,0	
Canfeno	954			0,91		11,76	2,51		5,65
β -pineno	979			1,79		4,34	1,10		
Mirceno	991								1,05
<i>p</i> -cimeno	1025					0,72			
<i>o</i> -cimeno	1026		32,2		4,60			14,0	
Limoneno	1029			1,81		5,41			
1,8-cineol	1031			23,61		28,59	7,54		
γ -terpineno	1060		3,67		0,90			64,0	
Linalol	1097			31,22					
cis-tujona	1102						40,61		
trans-tujona	1114						15,10		
Cânfora	1146			12,80		26,31	13,90		
Borneol	1169						2,21		
Neral	1238								7,53
Geranial	1267								10,73
Timol	1290		2,17		1,90			21,0	
Carvacrol	1299		56,8		92,6				
Eugenol	1359			8,08					
Acetato de Geranil	1381								3,81
Z-isoeugenol	1407	93,30							
Z-cariofileno	1409			1,67		3,06			
E-cariofileno	1419	2,47							
α -curcumeno	1481								9,25
Zingibereno	1494								20,81
α -farneseno	1506								11,36
β -bisaboleno	1506								5,34
Sesquifelandreno	1523								10,45
Acetato de eugenol	1523	1,80							
Benzoato de benzila	1760	2,43							
total		100	95,94	83,02	100	100	87,79	100	87,93

Compostos listados em ordem de eluição; IR = Índice de Retenção (calculado); (Cz) *Cinnamomum zeylanicum*, (Lg) *Lippia graveolens*, (Ob) *Ocimum basilicum*, (Ov) *Origanum vulgare*, (Ro) *Rosmarinus officinalis*, (So) *Salvia officinalis*, (Tv) *Thymus vulgaris*, (Zsp.) *Zingiber officinale*.

6 DISCUSSÃO

6.1 Perfil de suscetibilidade de *Candida* spp frente a óleos essenciais extraídos de condimentos

A candidíase é a infecção fúngica oportunista mais comum, destacando-se, entre suas formas clínicas, a orofaríngea em pacientes com AIDS (SAMARANAYAKE, 1992; KORTING et al, 1999). O número de indivíduos com AIDS vem aumentando muito nos últimos anos, e existem numerosos relatos indicando a presença de lesões recorrentes por *Candida* spp principalmente na mucosa oral desses pacientes (SANGEORZAN et al, 1994; REX et al, 1995; REVANKAR et al, 1996; VAZQUEZ, 2000; WALSH et al, 2000). A imunossupressão avançada e a exposição aos antifúngicos azólicos são considerados importantes fatores de risco para o desenvolvimento de resistência a estes antifúngicos (MAENZA et al, 1996; CANUTO et al, 2000). Desta forma, novas propostas terapêuticas contra candidíase orofaríngea tornaram-se um importante alvo de pesquisas.

A fitoterapia tem sido o escopo de diversas investigações científicas relacionando usos, efeitos e propriedades farmacológicas das plantas medicinais. Estas, em geral, têm ampla habilidade de sintetizar substâncias odoríferas, das quais a maioria são terpenos ou seus derivados oxigenados. Nas últimas décadas, numerosos estudos *in vitro* e *in vivo* foram realizados avaliando a atividade antimicrobiana de óleos essenciais (COSENTINO et al, 1999; PINA-VAZ et al, 2004; TAMPIERI et al, 2005), pois desde a antiguidade sabe-se que muitas plantas evidenciam tal propriedade (DEANS et al, 1989).

A metodologia utilizada para avaliar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais é um fator de considerável importância. Neste sentido, aspectos como inóculo, meio de cultura utilizado, tempo e temperatura de incubação dos ensaios devem ser averiguados (ESPINEL-INGROFF & PFALLER, 2003). De maneira geral, os métodos de diluição em caldo são mais adequados para testar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais do que métodos como difusão em disco ou diluição em ágar. Isto porque os óleos são substâncias voláteis, podendo ter sua concentração reduzida em ensaios com discos, ou, por serem hidrofóbicos, podem

se difundir de forma não homogênea no ágar cuja base é hidrofílica (CHAND et al, 1994). Outro fator favorável à diluição em caldo é que o RPMI 1640, meio mais recomendado nesta técnica, é quimicamente definido e não tem evidenciado interação com agentes antifúngicos; por isto é o preconizado pelo NCCLS (atual CLSI), podendo ser também, seguramente utilizado em ensaios com óleos essenciais.

Conforme o documento M27-A2 (NCCLS, 2002), as leituras realizadas para determinação de CIM utilizando azólicos, têm como parâmetro a inibição parcial do crescimento fúngico, pois estes agentes não inibem totalmente o crescimento devido a sua restrita ação fungistática. Por outro lado, o mesmo documento indica leitura de inibição total de crescimento e avaliação de concentração fungicida, quando a droga testada for a anfotericina B. Com base nessas considerações, no presente estudo optou-se por avaliar a atividade antifúngica dos óleos essenciais sob três formas: CIM_p (concentração que inibiu 50% do crescimento fúngico, quando comparado ao controle), CIM_T (concentração que inibiu totalmente o crescimento fúngico) e CFM (concentração fungicida). Através dos resultados obtidos, observou-se que CIM_p evidenciou menores diferenças significativas quando as comparações foram submetidas ao método de Mann Whitney; ao mesmo tempo, este parâmetro apresentou menor reprodutibilidade nos ensaios quando comparado com CIM_T e CFM, que demonstraram melhor reprodutibilidade. Com base nas considerações acima, sugere-se que CIM_T e CFM são parâmetros melhores do que CIM_p para se avaliar a atividade antifúngica de óleos essenciais.

De acordo com a literatura, classificou-se a atividade antifúngica dos óleos essenciais em forte (até 500 µg/mL), moderada (entre 500 µg/mL e 1500 µg/mL) e fraca (maior do que 1500 µg/mL) (ALIGIANNIS et al, 2001; SARTORATTO et al, 2004).

A espécie do gênero *Candida* mais isolada da cavidade oral de pacientes com AIDS é *C. albicans* (63-93%), seguida por *C. glabrata* (14-21%), *C. krusei* (4-10%), *C. tropicalis* (2-7%) e outras. Pacientes com imunossupressão severa apresentam elevadas taxas de colonização e alta frequência de espécies não-*albicans* (FETTER et al, 1993). No Brasil, Milan et al (1998) observaram que 22% dos pacientes infectados ou colonizados por *Candida* spp apresentavam espécies não-*albicans* na cavidade oral, com predominância de *C. glabrata* e *C. krusei*. Este fato é preocupante pois os valores de CIM ao fluconazol para estas duas espécies são, via

de regra, mais elevados do que para *C. albicans*, visto que são naturalmente menos sensíveis aos azóis (MILLON et al, 1994b; REX et al, 1995; REX et al, 1997). De forma semelhante ao fluconazol, os óleos essenciais demonstraram-se menos ativos sobre *C. krusei* e *C. glabrata* do que frente a outras espécies de *Candida*, fato já esperado segundo Mondello et al (2003). Este achado é instigante, pois se sabe que os mecanismos de ação antifúngica dos azóis e dos óleos essenciais são diferentes. É amplamente conhecido que os azóis inibem a síntese do ergosterol dos fungos através da ligação à enzima lanosterol 14- α -demetilase, o que provoca alterações na membrana citoplasmática fúngica, impedindo o desenvolvimento do mesmo (GOODMAN & GILMAN, 1996); já os óleos essenciais atuam através de mecanismos não totalmente estabelecidos. Sugere-se, porém, que a maioria deles exerça sua atividade antimicrobiana através de modificações na estrutura da parede celular do microrganismo, mais especificamente alterando a permeabilidade da membrana citoplasmática pela modificação no gradiente de íons de hidrogênio (H^+) e potássio (K^+). Esta alteração conduz à deterioração de processos essenciais à sobrevivência da célula tais como o transporte de elétrons, o transporte de proteínas, passos da fosforilação e outras reações dependentes de enzimas. Desta forma, ocorre perda do controle quimiosmótico da célula e a conseqüente morte do microrganismo (DORMAN & DEANS, 2000). Acredita-se também que o rompimento da parede celular dos microrganismos deva-se ao caráter lipofílico dos óleos essenciais que se acumulam nas membranas (COWAN, 1999). Este acúmulo gera consideráveis efeitos na estrutura e propriedades funcionais das membranas. Enfim, muitos dos efeitos tóxicos dos terpenos, cicloalcanos, alcanos, álcoois e fenóis podem ser explicados por sua interação com a membrana citoplasmática dos microrganismos (SIKKEMA et al, 1995).

Diante destas considerações, sugere-se que, apesar das diferenças nos mecanismos de ação entre fluconazol e óleos essenciais, possivelmente, *C. krusei* e *C. glabrata* possuam algumas características em sua estrutura celular que dificultem a entrada dos óleos essenciais e, conseqüentemente poucos efeitos decorrentes da desintegração da membrana celular fúngica são observados. Estudos apontam para a exacerbada ação de bombas de efluxo em *C. krusei* e *C. glabrata* como a principal responsável pela resistência aos azóis (MARICHAL et al, 1995). Desta forma, seria possível atribuir os elevados CIMs aos óleos essenciais, nestas espécies, pelos mesmos fatores.

Candida dubliniensis é uma espécie considerada emergente, estando originalmente associada à colonização e infecção oral em pacientes com AIDS (SULLIVAN et al, 1995; SULLIVAN & COLEMAN, 1997). Acredita-se que seus fatores de virulência sejam semelhantes aos de *C. albicans*, entretanto, *C. dubliniensis* produz maior atividade de proteinase que *C. albicans*, sendo mais aderente que esta às células epiteliais orais na presença de glicose. Por outro lado, a produção de hifas é mais lenta em *C. dubliniensis*, sugerindo que esta espécie tenha menor habilidade para invadir os tecidos (SULLIVAN et al, 1999). A maioria dos isolados é suscetível aos antifúngicos azólicos, mas as CIMs observadas para inibição desta espécie são freqüentemente maiores do que as observadas para *C. albicans* (PFALLER et al, 1999a). Também, foi constatado que *C. dubliniensis* desenvolve resistência aos azólicos mais fácil e rapidamente do que *C. albicans* (MORAN et al, 1997). No presente estudo, ao comparar estas duas espécies de *Candida*, de modo geral, *C. dubliniensis* mostrou-se mais sensível aos óleos essenciais do que *C. albicans*. Este fato pode ser devido a maior hidrofobicidade da parede celular de *C. dubliniensis* do que de *C. albicans* quando incubadas a 37°C (HANZEN et al, 2001). E está bem estabelecido que microrganismos com parede celular hidrofóbica têm maior afinidade por compostos hidrofóbicos do que aqueles com parede celular mais hidrofílica (VAN LOOSDRECHT et al, 1990; JARLIER & NIKAIDO, 1994).

6.1.1 Perfil de suscetibilidade de *Candida* spp aos óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Ocimum basilicum* (manjeriço) e *Salvia officinalis* (sálvia).

Os óleos essenciais de alecrim, manjeriço e sálvia não demonstraram atividade antifúngica *in vitro* nas concentrações testadas. Os constituintes majoritários do óleo essencial de alecrim incluíram 1,8-cineol (28,59%) e cânfora (26,31%), resultados semelhantes aos encontrados por Mangena & Muyima (1999). Por outro lado, Santoyo et al (2005) evidenciaram também a presença de borneol no óleo essencial de alecrim, composto não identificado na presente pesquisa. Não foi possível verificar atividade antifúngica do óleo essencial de alecrim frente ao gênero *Candida*, fato discordante ao exposto pelos autores que evidenciaram tal ação.

Diante dessas considerações, cabe ressaltar, que a técnica utilizada por Mangena & Muyima (1999) diferiu da empregada no presente estudo, o que impede comparações mais rigorosas entre os resultados. Estes autores utilizaram a difusão em disco, a qual é considerada útil para fins de triagem de atividade antimicrobiana; entretanto, a técnica de microdiluição em caldo, utilizada no presente estudo, oferece o melhor potencial para bioensaios, constituindo-se, desta forma, na metodologia padrão (HADACEK & GREGER, 2000). É importante relatar também, que Santoyo et al (2005) evidenciaram forte atividade antifúngica do óleo de alecrim, com CIM de 250µg/mL, entretanto, destacaram potente ação fungicida para o borneol, e conforme já comentado, este composto não esteve presente no óleo essencial utilizado no presente estudo.

No óleo essencial de manjeriço, foram identificados linalol (31,22%) e 1,8-cineol (23,61%) como constituintes majoritários, concordando parcialmente com Opalchenova & Obreshkova (2003), pois não foi detectado o metil-chavicol, substância normalmente presente no óleo de manjeriço. A atividade antimicrobiana deste óleo está bem estabelecida (OPALCHENOVA & OBRESHKOVA, 2003), porém, nas concentrações testadas no presente estudo, o óleo de manjeriço não demonstrou atividade antimicrobiana frente a *Candida* spp; este achado contradiz os relatos de Cáceres (1999). Entretanto, acredita-se que, aumentando a concentração do óleo, poderia ser evidenciada inibição do crescimento fúngico.

O óleo essencial de sálvia tem conhecida atividade antibacteriana (PEREIRA et al, 2004), porém a antifúngica é menos relatada na literatura. Neste sentido, Velickovic et al (2003) observaram que o óleo de sálvia foi mais ativo contra bactérias do que frente a leveduras. No presente estudo não foi constatada atividade antifúngica para este óleo essencial, e foi identificada a cis-tujona (40,61%) como constituinte majoritário presente no óleo de sálvia, o que corrobora com dados da literatura (LORENZI & MATOS, 2002; VELICKOVIC et al, 2003).

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 microrganismos utilizados.

Os óleos essenciais de canela, orégano mexicano, orégano, tomilho e gengibre evidenciaram significativa atividade antifúngica. Diante disto, foram analisados 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 pelo orégano mexicano, canela, tomilho e pelo gengibre, o qual apresentou a menor atividade antifúngica. De modo geral, as CIMs dos óleos de canela e tomilho foram muito semelhantes e *C. krusei* foi a espécie que requereu as maiores CIM₅₀ e CIM₉₀ para todos os óleos essenciais, podendo assim, ser considerada a espécie de *Candida* mais resistente.

6.1.2 Perfil de suscetibilidade de *Candida* spp ao óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* (canela)

O óleo essencial de canela evidenciou atividades moderada e fraca frente a *Candida* spp, pois as CIM_T variaram de 800µg/mL a 1600µg/mL. Quale et al (1996), também estudando a atividade *in vitro* do óleo de canela frente a isolados de *Candida* spp, sensíveis e resistentes ao fluconazol, observaram CIMs entre 50 µg/mL e 30000µg/mL. Estes dados indicam a existência de grandes variações nas suscetibilidades entre espécies de *Candida* diferentes ou até mesmo entre isolados da mesma espécie. Isto ocorre porque cada isolado pode apresentar composição variável na parede celular (CALDERONE & BRAUN, 1991), bem como diferenças na expressão de genes que codificam bombas de efluxo (WHITE et al, 1998), resultando em variadas CIMs. É pertinente destacar também, a importância da pesquisa *in vivo* sobre o potencial antifúngico do óleo de canela, pois Quale et al (1996) administraram uma formulação a base de óleo de canela durante uma semana em cinco pacientes com HIV e candidíase oral, e, após o tratamento, três dos cinco pacientes evidenciaram redução no quadro de candidíase. Desta forma, os autores sugerem novos estudos *in vivo* objetivando estabelecer o uso da canela na candidíase orofaríngea. Na constituição química do óleo essencial de canela do

presente estudo, detectou-se Z-isoeugenol como composto majoritário, e não o aldeído cinâmico e eugenol, como seria o esperado (LORENZI & MATOS, 2002). Este fato, possivelmente tenha ocorrido devido a uma reação de isomerização a qual pode transformar o eugenol em isoeugenol (CERVENÝ et al, 1987).

De modo geral, pode-se afirmar que as espécies mais sensíveis ao óleo de canela foram, em ordem decrescente de suscetibilidade: *C. tropicalis* (S), *C. dubliniensis* (S), *C. albicans* (S), *C. dubliniensis* (R), *C. albicans* (R), *C. glabrata*, *C. tropicalis* (R) e *C. krusei*. Foram observadas diferenças significativas, pela CIM_T, onde *C. albicans* (S) evidenciaram-se mais sensíveis ao óleo de canela do que os de *C. albicans* (R) ($p=0,021^*$), e pela CIM_P, *C. dubliniensis* (S) foram mais sensíveis do que *C. dubliniensis* (R) ($p<0,001^{**}$); também, *C. dubliniensis* (S) foi mais sensível ao óleo de canela do que *C. albicans* (S) ($p<0,022^*$). De forma similar, quando foram comparados os isolados resistentes ao fluconazol, na CFM verificou-se que *C. albicans* (R) foi mais resistente do que *C. dubliniensis* (R) ($p=0,030^*$). Ao comparar os grupos de *C. albicans* com *Candida* não-*albicans*, foram utilizadas duas formas diferentes: na primeira, o grupo de não-*albicans* incluiu *C. dubliniensis*, e na segunda, esta espécie foi excluída do grupo; isto porque os CIMs encontrados para estes isolados são bastante baixos, o que descaracteriza o grupo de *Candida* não-*albicans* que é conhecido por ser refratário aos tratamentos utilizando fluconazol, ou seja, possuem CIMs superiores aos encontrados para *C. albicans*. Neste contexto, foram observadas médias aritméticas de CIM_P maiores para *C. albicans* do que para o grupo *Candida* não-*albicans*, incluindo *C. dubliniensis*, ($p=0,004^{**}$). Ao excluir *C. dubliniensis*, também se observou, pelos parâmetros de CIM_P e CFM, que *C. albicans* (S) foi significativamente mais resistente do que o *Candida* não-*albicans* (S); contudo, ao analisar o grupo de resistentes, observou-se dados contrários, pois através dos três parâmetros, *Candida* não-*albicans* (R) apresentaram-se mais resistentes do que *C. albicans* (R). Diante destas considerações, sugere-se que frente ao óleo essencial de canela, *C. albicans* (S) foram mais sensíveis que as *C. albicans* (R), que *C. dubliniensis* foi mais sensível do que *C. albicans*, porém não foi observada relação estável ao compararmos o grupo de *C. albicans* com o de *Candida* não-*albicans*, impossibilitando caracterizar qual o grupo é mais sensível ao óleo essencial de canela.

6.1.3 Perfil de suscetibilidade de *Candida* spp ao óleo essencial de *Lippia graveolens* (orégano mexicano)

A atividade antifúngica do óleo essencial de orégano mexicano revelou-se como forte a moderada, evidenciando médias aritméticas de CIM_T entre 500 μ g/mL e 800 μ g/mL. Entretanto, estas concentrações foram superiores as observadas por Salgueiro et al (2003a), onde óleos essenciais com alto conteúdo fenólico evidenciaram CIMs na faixa de 120 μ g/mL a 270 μ g/mL. Estas diferenças poderiam ser devido a variações no conteúdo de carvacrol e timol observadas entre os dois estudos; o óleo essencial aqui utilizado, embora possuísse alta concentração de carvacrol, apresentou baixo teor de timol, fator que deve ser considerado, pois alguns estudos apontam para o provável sinergismo entre estes dois compostos (DIDRY et al, 1993). Quanto à composição química, no óleo essencial de orégano mexicano foram identificados principalmente carvacrol (56,8%) e o-cimeno (32,2%), constituintes semelhantes aos encontrados por Salgueiro et al (2003a) e Vazquez & Dunford (2005).

De modo geral, pode-se afirmar que as espécies mais sensíveis ao óleo de orégano mexicano foram, em ordem decrescente de suscetibilidade: *C. glabrata*, *C. tropicalis* (R), *C. albicans* (R), *C. dubliniensis* (S), *C. dubliniensis* (R), *C. albicans* (R) e igual suscetibilidade entre *C. tropicalis* (S) e *C. krusei*. Entretanto, diferenças significativas foram atribuídas apenas entre algumas comparações: nos três parâmetros utilizados (CIM_P , CIM_T e CFM), *C. albicans* (S) foi significativamente mais resistente do que *C. albicans* (R); pela CIM_P , constatou-se que *C. dubliniensis* (S) foram mais sensíveis do que *C. dubliniensis* (R) ($p=0,031^*$), e pela CIM_T , *C. albicans* (S) foi mais resistente do que *C. dubliniensis* (S) ($p=0,047^*$). Todos os parâmetros evidenciaram que os isolados de *C. dubliniensis* (R) foram mais sensíveis do que os de *C. albicans* (R). Nas comparações entre *C. albicans* (R) versus *Candida* não-*albicans* (R), incluindo *C. dubliniensis*, todos os parâmetros detectaram que *C. albicans* (R) foram mais sensíveis do que *Candida* não-*albicans* (R).

6.1.4 Perfil de suscetibilidade de *Candida* spp ao óleo essencial de *Origanum vulgare* (orégano)

O óleo essencial de orégano evidenciou atividade antifúngica forte a moderada, com CIM_T variando de 200 $\mu\text{g/mL}$ a 800 $\mu\text{g/mL}$. Manohar et al (2001) também avaliaram tal atividade, através da microdiluição em caldo, e observaram inibição completa do crescimento de *C. albicans* a 250 $\mu\text{g/mL}$. Este resultado é semelhante ao encontrado no presente estudo, onde a atividade antifúngica evidenciou médias aritméticas de CIMs entre 393,3 $\mu\text{g/mL}$ e 386,7 $\mu\text{g/mL}$ para *C. albicans* (S) e (R), respectivamente. É importante destacar a intensa atividade fungicida do óleo de orégano, pois as CFMs evidenciaram resultados idênticos a CIM_T .

Por outro lado, Manohar et al (2001) encontraram valores para CIM_P de 62,5 $\mu\text{g/mL}$, enquanto no presente estudo, observou-se CIM_P na faixa de 245 $\mu\text{g/mL}$ a 288 $\mu\text{g/mL}$ para *C. albicans* (S) e (R), respectivamente. 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* que recebeu tratamento através da administração oral diária do óleo de orégano durante 30 dias, 80% dos animais sobreviveram; tal resultado não foi observado no grupo de animais tratados apenas com óleo de oliva, os quais evoluíram ao óbito em 10 dias. Este achado sinaliza 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.

Conforme descrito por Cáceres (1999), no presente estudo, identificou-se também o carvacrol (92,6%) como constituinte majoritário do óleo essencial de orégano. Da mesma forma, os presentes resultados estão de acordo com Sivropoulou et al (1996), que afirmaram que óleos essenciais do gênero *Origanum* evidenciaram atividade antifúngica contra *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*. As elevadas concentrações de compostos fenólicos e baixas de hidrocarbonetos são as prováveis responsáveis pela potente ação antifúngica do óleo de orégano. Isoladamente, os constituintes carvacrol e timol são responsáveis pela forte atividade antimicrobiana, já que outros compostos como γ -terpineno e *p*-cimeno, normalmente

não evidenciam tal atividade (SIVROPOULOU et al, 1996; ALIGIANNIS et al, 2001; ELGAYYAR et al, 2001). É oportuno lembrar que Raduđienė et al (2005) observaram fraca atividade antifúngica para óleos essenciais de orégano que apresentavam hidrocarbonetos como compostos majoritários e baixas concentrações de fenóis (5%).

Não foi possível estabelecer uma conformidade de resultados entre CIM_P, CIM_T e CFM para as diferentes espécies de *Candida* frente ao óleo de orégano. Quando se considerou CIM_P, observou-se que *C. tropicalis* (R) foi a espécie mais sensível. Para CIM_T, observou-se *C. dubliniensis* (R) e para CFM, *C. albicans* (R) foi a espécie mais sensível ao óleo essencial de orégano. Entretanto, pôde-se observar que *C. krusei* foi a espécie mais resistente. Estatisticamente, evidenciou-se pela CIM_T, que *C. dubliniensis* (S) foram mais resistentes do que *C. dubliniensis* (R) ($p=0,029^*$). Ao excluir *C. dubliniensis* do grupo de *Candida* não-*albicans*, observou-se que os isolados *Candida* não-*albicans* (S) e (R) demonstraram-se mais resistentes do que *C. albicans* (S) e (R) frente ao óleo de orégano.

6.1.5 Perfil de suscetibilidade de *Candida* spp ao óleo essencial de *Thymus vulgaris* (tomilho)

O óleo essencial de tomilho evidenciou CIMs na faixa de 200 µg/mL a 3200 µg/mL. Quanto as CIM_T, as médias aritméticas variaram entre moderadas e fracas, oscilando de 933,3 µg/mL a 2800 µg/mL. Em relação as CFMs, os resultados obtidos foram muito semelhantes aos achados para CIM_T, com médias variando de 946,7 µg/mL a 2800 µg/mL, destacando-se a significativa atividade fungicida do óleo essencial de tomilho. A composição química do óleo aqui utilizado evidenciou como constituintes majoritários o γ -terpineno (64%) e o timol (21%). Esta composição é discordante da expressa por Pina-Vaz et al (2004) que encontraram 70,3% de carvacrol, 11,7% de *p*-cimeno e 0,6% de timol para o óleo essencial de tomilho. Todavia, diferenças entre os constituintes dos óleos essenciais são aceitas devido à presença de quimiotipos, diferente época e horário de colheita da planta, método de extração aplicado, entre outros (SIMÕES et al, 1999).

De modo geral, pode-se afirmar que as espécies mais sensíveis ao óleo de tomilho foram em ordem decrescente de suscetibilidade: *C. dubliniensis* (S), *C. tropicalis* (S) *C. dubliniensis* (R), *C. albicans* (R), *C. glabrata*, *C. albicans* (S), *C. tropicalis* (R) e *C. krusei*. Estatisticamente, detectou-se que *C. albicans* (S) foi significativamente mais sensível do que *C. albicans* (R), pela CIM_T ($p=0,026^*$). Através dos três parâmetros de suscetibilidade (CIM_P, CIM_T e CFM), *C. dubliniensis* (S) foram significativamente mais sensíveis do que *C. dubliniensis* (R). Da mesma forma, *C. dubliniensis* (S) foi mais sensível do que *C. albicans* (S) ($p<0,01^{**}$). *C. albicans* (S) foi significativamente mais resistente do que *Candida* não-*albicans* (S) (incluindo *C. dubliniensis*) ($p<0,001^{**}$). Por outro lado, ao comparar *C. albicans* e *Candida* não-*albicans* (excluindo-se *C. dubliniensis*), pôde-se verificar através da CIM_T ($p=0,007^{**}$) e CFM ($p=0,018^*$), que *C. albicans* (R) foram significativamente mais suscetíveis do que *Candida* não-*albicans* (R).

O óleo essencial de tomilho demonstrou atividade moderada a fraca frente a *Candida* spp, o que está em desacordo com a atividade antimicrobiana relatada em diversas publicações. Tal fato pode ser explicado pela ausência de carvacrol e baixo conteúdo de timol, bem como pela presença de γ -terpineno como constituinte majoritário no óleo utilizado (COSENTINO et al, 1999). O espectro de atividade antimicrobiana demonstrada pelo γ -terpineno está de acordo com estudos prévios que sugerem que hidrocarbonetos são os compostos com menor eficácia antimicrobiana (LATTAOUI & TANTAOU-ELARAKI, 1994). Estes dados também corroboram com relatos descritos por Simões et al (1999), de que o elevado teor de timol e carvacrol é responsável pelas atividades antibacteriana e antifúngica do óleo essencial de tomilho que podem ser superiores ao fenol. Ainda, em pesquisa realizada por Cosentino et al (1999), a atividade antimicrobiana determinada frente a *C. albicans*, através do método da microdiluição em caldo, evidenciou CIM de 450 $\mu\text{g/mL}$ para os óleos essenciais de *Thymus capitatus* e *T. herba-barona* 'a', enquanto *T. herba-barona* 'b', caracterizada por maior conteúdo fenólico do que os outros óleos analisados apresentou CIM de 225 $\mu\text{g/mL}$. Dentre os compostos isolados, α -pineno, *p*-cimeno, γ -terpineno e linalol não demonstraram atividade antifúngica nas concentrações testadas, enquanto timol e carvacrol evidenciaram CIM de 112,5 $\mu\text{g/mL}$. Este estudo confirmou que a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de tomilho é devida, principalmente, ao alto conteúdo de

compostos fenólicos. Em adição, efeitos sinérgicos ou antagonistas entre alguns componentes podem também afetar a atividade antimicrobiana exercida pelos óleos essenciais. De forma semelhante, Pina-Vaz et al (2004), evidenciaram que os óleos de *T. vulgaris* e *T. zygis* que apresentaram carvacrol e timol como constituintes majoritários, respectivamente, demonstraram atividade antifúngica similar, porém superior ao óleo de *T. mastichina*, o qual não apresentou carvacrol nem timol, mas sim 1,8-cineol como constituinte majoritário. Enfim, conclui-se que o óleo de tomilho utilizado no presente estudo não evidenciou a atividade antifúngica esperada, fato que pode ser explicado, conforme citado anteriormente, devido ao baixo conteúdo de compostos fenólicos nele encontrado. De acordo com Faleiro et al (2002), que estudaram algumas espécies de *Thymus* colhidas em diferentes locais de Portugal, os óleos essenciais isolados de tais espécies demonstraram variadas atividades antimicrobianas, indicando que o espectro de ação dos óleos essenciais está intimamente relacionado aos seus constituintes.

6.1.6 Perfil de suscetibilidade de *Candida* spp ao óleo essencial de *Zingiber* sp. (gengibre)

O óleo essencial de gengibre evidenciou variações de CIMs de 400 µg/mL a >3200 µg/mL. Para CIM_T, observou-se médias aritméticas entre 1982,6 µg/mL e >3200 µg/mL, ou seja, o óleo essencial de gengibre demonstrou atividade antifúngica considerada fraca ou nula nas concentrações testadas, dependendo da espécie de *Candida* avaliada. Em relação as CFMs, as médias aritméticas variaram de 2295,7 µg/mL a >3200 µg/mL, sendo levemente superiores às médias encontradas para CIM_T, indicando, desta forma, ação fungicida menos potente do óleo essencial de gengibre quando comparado aos óleos avaliados anteriormente. A fraca atividade antifúngica do óleo essencial de gengibre pode ser explicada, pois de acordo com Chen et al (1985), os princípios ativos antimicrobianos de diversas plantas empregadas como condimentos são termolábeis, e no caso específico do gengibre, os autores relataram reduzida atividade antimicrobiana após seu aquecimento. Da mesma forma, as discrepâncias observadas entre pesquisas

envolvendo a atividade antimicrobiana do óleo essencial de gengibre podem ser explicadas pelas variações de sazonalidade, de geografia e biodiversidade que interferem nas propriedades farmacológicas do rizoma (DOUSSOT et al, 2002; TALLEY et al, 2002; TAVEIRA et al, 2003). Grégio et al (2006) avaliaram as propriedades antimicrobianas do extrato de gengibre frente a microrganismos comumente encontrados na cavidade oral tais como *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*, observando-se CIMs de 5000µg/mL para os extratos glicólico e hidroalcoólico, entretanto, o extrato etanólico e o óleo essencial não apresentaram atividade antimicrobiana efetiva nas condições experimentais empregadas. Lopez et al (2005) analisaram a eficácia de seis óleos essenciais, incluindo o de gengibre, frente a *C. albicans* e outros microrganismos, observando que o óleo de gengibre demonstrou-se pouco ativo. Desta forma, os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com os dados da literatura, visto que o óleo de gengibre demonstrou a menor atividade antimicrobiana, quando comparado aos óleos essenciais de orégano, orégano mexicano, canela e tomilho. Por fim, sugere-se que testes de atividade antimicrobiana utilizando o gengibre devem ser planejados com óleo obtido por método que não envolva seu aquecimento, como a extração por fluido supercrítico, por exemplo, para impedir a degradação de seus princípios ativos.

A composição química do óleo essencial de gengibre revelou como constituinte majoritário o zingibereno (20,81%), seguido por α -farneseno (11,36%), geranial (10,73%), sesquifelandreno (10,45%), α -curcumeno (9,25%), Neral (7,53%), β -bisaboleno (5,34%), entre outros. Estes resultados são parcialmente similares aos explanados por Lorenzi & Matos (2002), onde a análise fitoquímica de rizomas de gengibre demonstrou a presença de 1% a 2,5% de óleo essencial, em cuja composição foram encontrados citral, cineol, borneol, zingibereno e bisaboleno.

De modo geral, observou-se que as espécies mais sensíveis ao óleo de gengibre foram em ordem decrescente de suscetibilidade: *C. dubliniensis* (R), *C. dubliniensis* (S), *C. albicans* (R), *C. albicans* (S), *C. glabrata*, *C. tropicalis* (R) que foi igual a *C. tropicalis* (S), e igual a *C. krusei*. Observou-se estatisticamente, através de CIM_T e CFM, que *C. dubliniensis* (R) foi mais sensível ao óleo de gengibre do que *C. dubliniensis* (S) ($p < 0,001^{**}$). Também se observou, através dos três parâmetros, que *C. albicans* (R) é mais resistente do que *C. dubliniensis* (R). As comparações entre *C.*

albicans (R) versus *Candida não-albicans* (R) (incluindo-se *C. dubliniensis*) também, através dos três parâmetros, indicaram que *C. albicans* (R) é mais resistente do que *Candida não-albicans* (R) ($p < 0,007^{**}$).

6.2 Suscetibilidade de *C. albicans* e *C. dubliniensis*, sensíveis e resistentes ao fluconazol, frente a óleos essenciais extraídos de condimentos, com base na inibição de tubos germinativos.

C. albicans e *C. dubliniensis* podem se apresentar *in vivo* sob duas morfologias diferentes: fase leveduriforme e fase de pseudo-hifas e de hifas verdadeiras, que constituem a fase filamentosa. A fase leveduriforme é normalmente predominante durante a colonização de superfícies epiteliais, entretanto, a fase filamentosa tem sido associada com a invasão de tecidos (ODDS, 1994). Diversos estudos indicam que isolados de *C. albicans* incapazes de produzir tubos germinativos parecem ser menos virulentos (BENSEN et al, 2002; SAVILLE et al, 2003). Neste contexto, a pesquisa por substâncias medicamentosas capazes de inibir a filamentação de *C. albicans* e *C. dubliniensis* pode ser uma alternativa para o tratamento de candidíases.

Diante dessas considerações, o presente estudo verificou a capacidade de óleos essenciais de inibir a formação de tubos germinativos por *C. albicans* e *C. dubliniensis*. Para tanto, o presente estudo determinou as menores concentrações de óleo essencial capazes de inibir a formação de tubos germinativos de *C. albicans* e *C. dubliniensis*; estas CIMs foram chamadas CIMTG. Ensaios para determinação de CFM envolvendo tubos germinativos não foram realizados. Com base na capacidade dos óleos essenciais de inibir a formação de tubos germinativos, verificou-se que todos os óleos foram eficazes, porém, em diferentes concentrações. Pôde-se observar, para *C. albicans* (S) e (R), bem como para *C. dubliniensis* (S), CIMTGs variando de 50 $\mu\text{g/mL}$ a $>3200 \mu\text{g/mL}$ para os óleos de orégano e alecrim, respectivamente. Deste modo, conclui-se que o óleo essencial de orégano foi o mais eficaz, sendo que o óleo de alecrim apresentou a menor capacidade de inibir tubos germinativos. Considerando-se todos os óleos estudados, detectaram-se médias aritméticas variando entre 66,07 $\mu\text{g/mL}$ e 2438,1 $\mu\text{g/mL}$, e entre 112 $\mu\text{g/mL}$ e

2933,3 $\mu\text{g/mL}$ para *C. albicans* (S) e (R), respectivamente; já os isolados de *C. dubliniensis* evidenciaram médias de 125,9 $\mu\text{g/mL}$ a 2466,7 $\mu\text{g/mL}$, estabelecendo-se, assim, que *C. dubliniensis* exigiu maior concentração de óleo essencial do que *C. albicans* para ter inibida a formação de tubos germinativos. Estatisticamente, constatou-se que *C. albicans* (S) foram significativamente mais sensíveis à inibição do que *C. albicans* (R), frente aos óleos de canela ($p=0,005^{**}$), orégano ($p=0,021^*$) e alecrim ($p=0,041^*$). Também, observou-se *C. albicans* (S) foi significativamente mais sensível do que *C. dubliniensis* (S) ($p<0,001^{**}$) frente ao óleo essencial de orégano. Conforme referido anteriormente, *C. dubliniensis* apresenta-se mais hidrofóbica do que *C. albicans* a 37°C (HANZEN et al, 2001), e quanto maior a hidrofobicidade celular, mais competente é a germinação (HANZEN & HANZEN, 1988); assim, pode-se explicar o resultado obtido no presente estudo, no qual *C. dubliniensis* requereu maior concentração de óleo essencial do que *C. albicans* para ter sua filamentação inibida.

Os isolados de *C. dubliniensis* (R) não foram incluídos no ensaio devido a não formação de tubos germinativos por parte dos mesmos. Tal fato pode ter ocorrido devido à resistência ter sido induzida *in vitro*, o que, possivelmente, alterou algumas características fenotípicas dos isolados, incluindo a propriedade de formar tubos germinativos.

Ao comparar as médias aritméticas obtidas para os testes de suscetibilidade *in vitro* realizados com os óleos essenciais, detectou-se que os valores encontrados para CIMTG foram inferiores aos valores de CIM_T. Resultados semelhantes foram observados por D'Auria et al (2005) ao investigar a ação do óleo de *Lavandula angustifolia* frente a *C. albicans*, concluindo que o óleo inibiu a formação de tubos germinativos em concentrações menores que a CIM. Salgueiro et al (2003b), também observaram tal fato ao testar a capacidade do óleo essencial de *Origanum virens* de inibir a filamentação por *Candida* spp. Pina-Vaz et al (2004) avaliaram a ação dos óleos essenciais de *Thymus vulgaris*, *T. zygis* e *T. mastichina* sobre a formação de tubos germinativos em *C. albicans*, observando também, que concentrações abaixo dos valores da CIM inibiram a formação de tubos germinativos. Com base nestas considerações, conclui-se que os óleos essenciais necessitam de concentrações menores para inibir a formação de tubos germinativos, ou seja, podem ser efetivos contra o dimorfismo de *C. albicans* e *C. dubliniensis* e, conseqüentemente, reduzir a progressão fúngica e invasão de tecidos devido à

redução da virulência. Os resultados obtidos no presente estudo são bastante semelhantes aos encontrados por Manohar et al (2001), que observaram CIMTG de 62 µg/ml para o óleo essencial de orégano sobre a formação de tubos germinativos em *C. albicans*, e no presente estudo a CIMTG foi 66,07 µg/mL.

6.3 Considerações finais

Os parâmetros de suscetibilidade CIM e CFM indicaram que os óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum* (canela), *Lippia graveolens* (orégano mexicano), *Origanum vulgare* (orégano) e *Thymus vulgaris* (tomilho) foram fungistáticos e fungicidas para todas as espécies de *Candida* estudadas, incluindo os isolados resistentes ao fluconazol. Todavia, *Zingiber officinale* (gingibre) não demonstrou eficácia frente a *C. krusei* e *C. tropicalis*. Em adição ao amplo espectro de atividade antifúngica dos óleos essenciais citados, cabe destacar que concentrações semelhantes de óleo essencial foram capazes de inibir o crescimento fúngico ou de serem fungicidas para isolados originalmente sensíveis e resistentes ao fluconazol. Além disso, alguns dos óleos também demonstraram moderada atividade contra espécies de *Candida* que naturalmente apresentam elevadas CIMs ao fluconazol, tais como *C. glabrata* e *C. krusei*. Diante destas considerações, faz-se necessária a continuidade de pesquisas envolvendo atividade antifúngica de óleos essenciais, pois os resultados do presente estudo indicam a eficácia destes produtos naturais frente a isolados resistentes ao fluconazol. Desta forma, os óleos essenciais podem, futuramente, se constituir numa alternativa de terapia ou profilaxia para os casos de candidíase orofaríngea que não respondem ao tratamento com fluconazol. Com base na observação que os óleos essenciais são ativos frente a espécies tanto sensíveis quanto resistentes ao fluconazol, sugere-se que, possivelmente, os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de resistência aos azólicos, tais como a superexpressão ou a mutação do gene ERG11 (MARICHAL et al, 1999), ou superexpressão de genes CDR e MDR que codificam bombas de efluxo (PRASAD et al, 1995; SANGLARD et al, 1995; WHITE et al, 1998), entre outros, não se manifestam frente aos óleos essenciais, com exceção para *C. krusei* e *C. glabrata* que naturalmente apresentam superexpressão dos genes que codificam bombas de

efluxo (MARICHAL et al, 1995). Neste sentido, Mondello et al (2003) tentaram induzir resistência ao óleo de *Melaleuca alternifolia* (árvore do chá) *in vitro*, não obtendo resultados favoráveis. Entretanto, deve-se averiguar quanto a ocorrência de uma resposta adaptativa que pode resultar na reprogramação da expressão genômica para proteger a parede celular da desintegração por monoterpenos e outros compostos de natureza lipofílica (PARVEEN et al, 2004).

Entre os óleos essenciais estudados, os que apresentaram carvacrol e timol como constituintes majoritários demonstraram-se mais eficientes. A potente ação do carvacrol e do timol como agentes antimicrobianos tem sido bastante reconhecida (LATTAOUI & TANTAOU-ELARAKI, 1994). O espectro da atividade antimicrobiana apresentado pelo óleo essencial de tomilho, que evidenciou o γ -terpineno como composto majoritário, está de acordo com estudos prévios demonstrando que hidrocarbonetos são compostos com fraca atividade antimicrobiana (LATTAOUI & TANTAOU-ELARAKI, 1994). Cabe destacar, também, que embora o carvacrol e o timol contribuam significativamente para a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, componentes presentes em menores quantidades podem exercer atividade antimicrobiana (LATTAOUI & TANTAOU-ELARAKI, 1994). Em adição, efeitos sinérgicos ou antagonistas entre alguns componentes podem afetar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais. A ação sinérgica do carvacrol e do timol contra algumas bactérias está bem comprovada (DIDRY et al, 1993). Conforme Cosentino et al (1999), o alto conteúdo de *p*-cimeno pode antagonizar a ação antimicrobiana dos fenóis, resultando em reduzida atividade.

É importante destacar as dificuldades de comparar os resultados obtidos com dados publicados na literatura, pois muitas vezes, apenas o nome comum da planta é especificado, mas não o botânico, bem como não são fornecidos os dados sobre a composição química do óleo. Da mesma forma, há muitos métodos diferentes de avaliação antimicrobiana disponíveis, e os resultados obtidos por estes não são diretamente comparáveis. Neste contexto, as discrepâncias encontradas em resultados obtidos em diferentes pesquisas podem ser explicadas.

O interesse pela medicina natural aumentou notavelmente nos últimos anos como conseqüência aos efeitos colaterais de drogas convencionais, bem como pela emergência da resistência antimicrobiana aos fármacos disponíveis. Com base nos resultados obtidos no presente estudo, pode-se constatar a potente atividade antifúngica *in vitro* frente a *Candida* spp, sobretudo dos óleos essenciais que

possuem alta concentração de compostos fenólicos como o orégano, orégano mexicano, e tomilho, embora este tenha demonstrado reduzida atividade no presente estudo. Diante destas considerações, os óleos essenciais de *Origanum vulgare* e *Lippia graveolens*, entre outros, podem representar uma alternativa às indústrias química e farmacêutica na manipulação de novos produtos com significativo potencial antimicótico. Além disso, comprovou-se outra grande vantagem dos óleos essenciais que é a capacidade de inibirem leveduras resistentes ao fluconazol, e conseqüentemente a outros antifúngicos como itraconazol, ravuconazol, cetoconazol e voriconazol que podem evidenciar resistência cruzada com este fármaco (MÜLLER et al, 2000; PFALLER et al, 2004). Com base no presente estudo, sugere-se o desenvolvimento de novas pesquisas sobre a atividade antimicrobiana de óleos essenciais incluindo, além de *Candida* spp, outras espécies fúngicas oportunistas como *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus* que causam infecções graves e de difícil tratamento. Torna-se importante também, a pesquisa de atividade sinérgica entre diferentes óleos essenciais, bem como entre óleos e agentes antifúngicos. Em conseqüência, há subsídios para embasar uma avaliação extensa e apropriada, incluindo investigações pré-clínicas e clínicas para a utilização de óleos essenciais de forma profilática através da ingestão de pequenas doses diárias por pacientes que têm grande risco de desenvolver candidíases refratárias aos tratamentos com antifúngicos azólicos.

7 CONCLUSÕES

7.1 Atividade fungistática de óleos essenciais extraídos de condimentos frente a leveduras do gênero *Candida*, sensíveis e resistentes ao fluconazol, através da determinação da CIM_P e CIM_T.

1. Verificou-se que os óleos essenciais de sálvia, manjeriço e alecrim não demonstraram atividade fungistática frente a *Candida* spp nas concentrações testadas.

2. De modo geral, a melhor atividade fungistática foi observada no óleo essencial de orégano, seguido pelo orégano mexicano, canela, tomilho e gengibre.

3. *C. krusei* foi a espécie mais resistente aos óleos essenciais, apresentando CIMs mais elevadas.

4. CIM_T foi considerada como melhor parâmetro do que a CIM_P para se avaliar atividade antifúngica de óleos essenciais devido a sua maior reprodutibilidade.

5. Verificou-se que os óleos essenciais que possuem elevado conteúdo de compostos fenólicos, como o carvacrol e o timol, evidenciam forte atividade frente a *Candida* spp.

7.2 Concentração fungicida mínima (CFM) dos óleos essenciais extraídos de condimentos frente a leveduras do gênero *Candida* sensíveis e resistentes ao fluconazol.

1. Os óleos essenciais de canela, orégano mexicano, orégano, tomilho e gengibre evidenciaram atividade fungicida frente ao gênero *Candida*, com exceção do óleo de gengibre frente a *C. krusei* e *C. tropicalis* (S) e (R).

2. De modo geral, a melhor atividade fungicida foi observada pelo óleo essencial de orégano, seguida pela dos óleos de orégano mexicano, canela, tomilho e gengibre.

7.3 Comparação entre a suscetibilidade de *C. dubliniensis* e *C. albicans*, sensíveis e resistentes ao fluconazol, frente aos óleos essenciais em estudo.

1. De modo geral, os isolados de *C. dubliniensis* foram mais sensíveis aos óleos essenciais do que os isolados de *C. albicans*.

7.4 Comparação dos perfis de suscetibilidade de *C. albicans* e não-*albicans* frente aos óleos essenciais em estudo.

1. Não foi possível caracterizar *C. albicans* como sendo mais ou menos sensível do que *Candida* não-*albicans* frente aos óleos essenciais, devido a variações observadas nos resultados.

7.5 Determinação da menor concentração de óleo essencial capaz de inibir a emissão de tubo germinativo (CIMTG) em *C. albicans* e *C. dubliniensis* sensíveis e resistentes ao fluconazol.

1. Todos os óleos essenciais estudados foram capazes de inibir a formação de tubo germinativo em *C. albicans* e *C. dubliniensis* sensíveis e resistentes ao fluconazol.

2. A melhor atividade inibitória foi observada como o óleo de orégano, seguida pelo óleo essencial de orégano mexicano, tomilho, canela, gengibre, manjerição e sálvia; o óleo de alecrim foi o menos efetivo.

3. De modo geral, *C. albicans* foi mais sensível do que *C. dubliniensis*, requerendo menores concentrações de óleo essencial para inibir a formação de tubo germinativo.

4. *C. albicans* (S) foi mais sensível do que *C. albicans* (R).

5. As concentrações de óleos essenciais capazes de inibir a emissão de tubos germinativos (CIMTG) foram sempre inferiores às CIMs e CFMs.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2001. 456p.

AGÊNCIA NACIONAL de VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução CNNPA nº 12, de 1978, p. 60.

ALIGIANNIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 9, p. 4168-4170, 2001.

ALVES, S. H. et al. First isolation of *Candida dubliniensis* in Rio Grande do Sul, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 39, n. 3, p.165-168, 2001.

ANDREWS, R. E.; PARKS, L. W.; SPENCE, K. D. Some effects of Douglas fir terpenes on certain microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 301-304, 1980.

ARFA, A. B. et al. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical Structure. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 149-154, 2006.

BAGINSKI, M. et al. Molecular modeling of membrane activity of amphotericin B, a polyene macrolide antifungal antibiotic. **Acta biochimica Polonica**, 2005, v. 52, n. 3, p. 655-658, 2005.

BARCHIESI, F. et al. In vitro activity of itraconazole against fluconazole-susceptible and -resistant *Candida albicans* isolates from oral cavities of patients infected with human immunodeficiency virus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 7, p. 1530-1533, 1994.

BARCHIESI, F. et al. Variation in fluconazole efficacy for *Candida albicans* strains sequentially isolated from oral cavities of patients with AIDS in an experimental murine candidiasis model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 5, p. 1317-1320, 1996.

BART-DELABESSE, E. et al. *Candida albicans* genotyping and studies with patients with AIDS developing resistance to fluconazole. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 11, p. 2933-2937, 1993.

BENSEN, E. S.; FILLER, S. G.; BERMAN, J. A forkhead transcription factor is important for true hyphal as well as yeast morphogenesis in *Candida albicans*. **Eukaryotic Cell**, v. 1, n. 5, p. 787-798, 2002.

BOKEN, D. J.; SWINDELLS, S.; RINALDI, M. G. Fluconazole-resistant *Candida albicans*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 17, n. 6, p. 1018-1021, 1993.

BORST, A. et al. 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.

BOZIN, B. et al. Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 5, p. 1822-1828, 2006

BRANDT, M. E. et al. *Candida dubliniensis* fungemia: the first four cases in North America. **Emerging Infectious Diseases**, v.6, n. 1, p. 46-49, 2000.

BURT, S. A.; REINDERS, R. D. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 162-167, 2003

CÁCERES, A. Plantas de uso medicinal en Guatemala. Guatemala: Editorial Universitaria, 1999. 402 p.

CALDERONE, A. R.; BRAUN, P. C. Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 55, n. 1, p. 1-20, 1991.

CANDIDO, R. C.; AZEVEDO, R. V. P., Ito II. Yeasts: the prevalence in the oral cavity of individuals with or without denture. **Revista de Odontologia da UNICID**, v. 7, n. 1, p. 27-33, 1995.

CANUTO, M. M. et al. Determinants for the development of oropharyngeal colonization or infection by fluconazole-resistant *Candida* strains in HIV-infected patients. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 19, n. 8, p. 593-601, 2000.

CASANOVA, M. et al. Hemin induces germ tube formation in *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 10, p. 4360-4364, 1997.

CASSONE, A.; SULLIVAN, P.A.; SHEPHERD, M.G. N-acetyl-D-glucosamine-induced morphogenesis in *Candida albicans*. **Microbiologica**, v. 8, n. 1, p. 85-99, 1985.

ČERVENÝ, L. et al. Isomerization of eugenol to isoeugenol. **Reaction Kinetics and Catalysis Letters**, v. 33, n. 2, 1987.

CHALLACOMBE, S. J. Immunologic aspects of oral candidiasis. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 78, n. 2, p. 202-10, 1994.

CHAMI, N. et al. Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 3, p. 217-226, 2004.

CHAND, S. et al. Rapid screening of the antimicrobial activity of extracts and natural products. **Journal of antibiotics**, v. 47, n. 11, p. 1295-1304, 1994.

CHAO, S. C.; YOUNG, D. G.; OBERG, C. J. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. **Journal of Essential Oil Research**, v. 12, p. 639-649, 2000.

CHEN, A.; SOBEL, J. D. Emerging azole antifungals. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v. 10, n. 1, p. 21-33, 2005

CHEN, H. C.; CHANG, M. D.; CHANG, T. J. Antibacterial properties of some spice plants before and after heat treatment. **Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi**, v. 18, n. 3, p. 190-195, 1985.

COLLIN, B.; CLANCY, C. J.; NGUYEN, M.H. Antifungal resistance in non-*albicans* *Candida* species. **Drug Resistance Updates**, v. 2, n. 1, p. 9-14, 1999.

COLOMBO, A. L. et al. Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method for azole antifungal susceptibility testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 535-540, 1995.

COSENTINO, S. et al. *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 130-135, 1999.

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

COX, S. D. et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 1, p. 170-175, 2000.

D'AURIA, F. D. et al. Antifungal activity of *Lavandula angustifolia* essential oil against *Candida albicans* yeast and mycelial form. **Medical Mycology**, v. 43, n. 5, p. 391-396, 2005.

DEANS, S. G.; SUBOTA, K. P.; KENNEDY, A. I. Biological activity of plant volatile oils and their constituents. **Planta Medica**, v. 55, p. 588, 1989.

DEMETZOS, C.; PERDETZOGLOU, D. K.; TAN, K. Composition and antimicrobial studies of the oils of *Origanum calcaratum* Juss. and *O. scabrum* Boiss. et Heldr. from Greece. **Journal of Essential Oil Research**, v. 13, n. 6, p. 460-462, 2001.

DIDRY, N.; DUBREUIL, L.; PINKAS, M. Antimicrobial activity of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde alone or in combination. **Pharmazie**, v. 48, n. 4, p. 301-304, 1993.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 22, p. 308-316, 2000.

DOUSSOT, F. et al. Extractives content in cooperage oak wood during natural seasoning and toasting; influence of tree species, geographic location, and singletree effects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 2, p. 5955-5961, 2002.

DUARTE, M. C. T et al. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 305-311, 2005.

DUPONT, B. et al. Mycosis and AIDS patients. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v.32, n. 1, p. 65-77, 1994.

ELGAYYAR, M. et al. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 7, p. 1019-1024, 2001.

ELLIS, D. Amphotericin B: spectrum and resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, n. 1, p. 7-10, 2002.

ESPINEL-INGROFF, A. Etest for antifungal susceptibility testing of yeasts. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 19, n. 4, p. 217-220, 1994.

ESPINEL-INGROFF, A.; BOYLE, K.; SHEEHAN, D. J. In vitro antifungal activities of voriconazole and reference agents as determined by NCCLS methods: Review of the literature. **Mycopathologia**, v. 150, n. 3, p. 101-115, 2001.

ESPINEL-INGROFF, A.; PFALLER, M. A. Susceptibility test methods: yeasts and filamentous fungi. In: MURRAY, P. R. et al. (Editor). **Manual of clinical microbiology**, 8. ed. Washington D.C: American Society for Microbiology, 2003. cap. 124, p. 1880-1893.

ESPINEL-INGROFF, A.; WHITE, T.; PFALLER, M. A. 1999. Antifungal agents and susceptibility tests. In: MURRAY, P. R. et al. (Editor). **Manual of clinical microbiology**, 7. ed. Washington D.C: American Society for Microbiology, 1999. cap. 126, p. 1640-1652.

EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY. Method for determination of minimal inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. Discussion document E. Dis. 7.1. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Taufkirchen, Germany. 2002.

FALEIRO, M. L. et al. Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 35–40. 2002.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

FEKETE-FORGÁCS, K.; GYURC, L.; LENKEY, B. Changes of virulence factors accompanying the phenomenon of induced fluconazole resistance in *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 43, n. 7/8, p. 273 – 279, 2000

FETTER, A. et al. Asymptomatic oral *Candida albicans* carriage in HIV-infection: frequency and predisposing factors. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 22, n. 2, p. 57-59, 1993.

FICHTENBAUM, C. J. et al. Refractory mucosal candidiasis in advanced human immunodeficiency virus infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, n. 5, p. 749-756, 2000.

FRANZ, R.; RUHNKE, M.; MORSCHHÄUSER, J. Molecular aspects of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 42, n. 7/8, p. 453-458, 1999.

GIORDANI, R. et al. Antifungal effect of various essential oils against *Candida albicans*. Potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 12, p. 990-995, 2004

GOLDMAN, G. H. et al. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 50, n. 1, p. 25-32, 2004.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 9. ed. Rio de Janeiro: MacGraw-Hill, 1996. 1436p.

GREENSPAN, D. Treatment of oropharyngeal candidiasis in HIV-positive patients. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 31, n. 2, p. 51-55, 1994.

GRÉGIO, A. M. T. et al. Ação antimicrobiana do *Zingiber officinale* frente à microbiota bucal. **Estudos de Biologia**, v. 28, n. 62, p. 61-66, 2006

GUTIERREZ, J. et al. *Candida dubliniensis*, a new fungal pathogen. **Journal of Basic Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 207-227, 2002.

HADACEK, F; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical Analysis**, v 11, n. 3, p. 137-147, 2000,

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 1081-1085, 2004.

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.

HANZEN, K. C.; WU, J. G.; MASUOKA, J. Comparison of the hydrophobic properties of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 2, p. 779-786, 2001.

HAZEN, B. W.; HAZEN, K. C.. 1988. Dynamic expression of cell surface hydrophobicity during initial yeast cell growth and before germ tube formation of *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, v. 56, p. 2521-2525, 1988.

HELANDER, I. K. et al. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 3590-3595, 1998.

HOWELL, S. A.; MALLET, A. I.; NOBLE, W. C. A comparison of the sterol content of the *Candida albicans* Darlington strain with other clinically azole-sensitive and -resistant strains. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 69, n. 5, p. 692–696, 1990.

HUBBARD, M. J.; SULLIVAN, P. A.; SHEPHERD, M. G. Morphological studies of N-acetylglucosamine induced germ tube formation by *Candida albicans*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 8, p. 696-701, 1985.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. Aromatic natural raw materials – Vocabulary. ISO 9235:1997. Geneva, 1997.

JABRA-RIZK, M. A. et al. Retrospective identification and characterization of *Candida dubliniensis* isolates among *Candida albicans* clinical laboratory isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected individuals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 2423-2426, 2000.

JARLIER, V.; NIKAIDO, D. H. Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. **FEMS Microbiology Letters**, v. 123, n. 1/2, p. 11-18, 1994.

JOHNSON, E. M. et al. Emergence of azole drug resistance in *Candida* species from HIV-infected patients receiving prolonged fluconazole therapy for oral candidosis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 35, n. 1, p. 103-114, 1995.

KATIYAR, S. K.; EDLIND, T. D. Identification and expression of multidrug resistance-related ABC transporter genes in *Candida krusei*. **Medical Mycology**, v. 39, n. 1, p. 109-116, 2001.

KENNEDY, M. J. Adhesion and association mechanisms of *Candida albicans*. **Current Topics in Medical Mycology**, v. 2, p. 73-169, 1988.

KNIGHT, L. F; LETCHER J. Growth of *Candida albicans* in saliva: Stimulation by glucose associated with antibiotics, corticosteroids and diabetes mellitus. **Journal of Infectious Diseases**, v. 123, n. 4, p. 371-377, 1971.

KOLOKOTRONIS, A. et al. Immunologic status in patients infected with HIV with oral candidiasis and hairy leukoplakia. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 78, n. 1, p. 41-46, 1994.

KORTING, H. S. et al. Effects of the human immunodeficiency virus (HIV) proteinase inhibitors saquinavir and indinavir on in vitro activities of secreted aspartyl proteinases of *Candida albicans* isolates from HIV-infected patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 8, p. 2038-2042, 1999.

KOSTIALA, I.; KOSTIALA, A. A. I.; KAHANPAA, A. Oral mycoses and their treatment. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 37, p. 87-101, 1979.

LAGUNA, F. et al. Patterns of fluconazole susceptibility in isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis due to *Candida albicans*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, n. 2, p. 124-130, 1997.

LAMBERT, R. J. W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 453-462, 2001.

LATTAOUI, N.; TANTAOUI-ELARAKI. Comparative kinetics of microbial destruction by the essential oils of *Thymus broussonetii*, *T. zygis* and *T. satureioides*. **Journal of Essential Oil Research.**, v. 6, p. 165-171, 1994.

LOEFFLER, J. et al. Phospholipid and sterol analysis of plasma membranes of azole-resistant *Candida albicans* strains. **FEMS Microbiology Letters**, v. 185, n. 1, p. 59-63, 2000.

LOEFFLER, J.; STEVENS, D. A. Antifungal drug resistance. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, n. 1, p. 31-41, 2003.

LOPEZ, P. et al. Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 17, p. 6939-6946, 2005.

LOPEZ-RIBOT, J. et al. Multiple resistant phenotypes of *Candida albicans* coexist during episodes of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus-infected patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 7, p. 1621-1630, 1999.

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

LYNCH, D. P. Oral candidiasis: history, classification, and clinical presentation. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 78, n. 2, p. 189-193, 1994.

MAENZA, J. R. et al. Risk factors for fluconazole-resistant candidiasis in human immunodeficiency virus - infected patients. **Journal of Infectious Diseases**, v. 173, n. 1, p. 219-225, 1996.

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. et al. Antifungal activities of organum oil against *Candida Albicans*. **Molecular and cellular Biochemistry**, v. 228, n. 1/2, p. 111-117, 2001.

MARICHAL, P et al. Origin of differences in susceptibility of *Candida krusei* to azole antifungal agents. **Mycoses**, v. 38, n. 3-4, p. 111-117, 1995.

MARICHAL, P. L. et al. Contribution of mutations in the cytochrome P450 14 alpha-demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 145, n. 10, p. 2701-2713, 1999

MARR, K. A. et al. Inducible azole resistance associated with a heterogeneous phenotype in *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 1, p. 52-59, 2001.

MEUNIER, F. Candidiasis. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 8, n. 5, p. 438-447, 1989.

MILAN, E. P. et al. Azole resistance among oral *Candida* species isolates from AIDS patients under ketoconazole exposure. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 32, n. 3, p. 211-216, 1998.

MILAN, E. P. et al. Oral colonization by *Candida* spp. among AIDS household contacts. **Mycoses**, v. 44, n. 7/8, p. 272-277, 2001.

MILLON, L. et al. Fluconazole-resistant recurrent oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive patients: persistence of *Candida albicans* strains with the same genotype. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 2, n. 4, p. 1115-1118, 1994a.

MILLON, L.; REBOUX, G.; BARALE, T. Émergence de *Candida glabrata* et *Candida krusei* chez des patients séropositifs pour le VIH atteints de candidose oropharyngée, traités de façon prolongée par le fluconazole. **Journal de mycologie médicale**, v. 4, n. 2, p. 90-92, 1994b.

MONDELLO, F. et al. *In vitro* and *in vivo* activity of tea tree oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic yeasts. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 5, p. 1223-1229, 2003

MORAN, G. P. et al. Antifungal drug susceptibilities of oral *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected subjects and generation of stable fluconazole-resistant derivatives *in vitro*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, p. 617-623, 1997.

MORAN, G. P. et al. Identification and expression of multidrug transporters responsible for fluconazole resistance in *Candida dubliniensis*. **Antimicrobial and Agents Chemotherapy**, v. 42, n. 7, p. 1819-1830, 1998.

MÜLLER, F. M. C. et al. Azole cross-resistance to ketoconazole, fluconazole, itraconazole and voriconazole in clinical *Candida albicans* isolates from HIV-infected children with oropharyngeal candidosis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, n. 2, p. 338-341, 2000

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; approved standard – 2. ed. NCCLS document M27-A2. Pennsylvania: NCCLS, 2002.

NOSTRO, A. et al. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococci* to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters**, v. 230, n. 2, p. 191-195, 2004.

ODDS, F. C. Factors that predispose the host to candidosis. In: Odds FC. *Candida and Candidosis*. 2. ed. London: Baillière Tindall; 1988. p. 93-116.

ODDS, F. C. Pathogenesis of *Candida* infections. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 31, p. 2-5, 1994.

ODDS, F. C; NUFFEL, L. V.; DAMS, G. Prevalence of *Candida dubliniensis* isolates in a yeast stock collection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 10, p. 2869-2873, 1998.

ONAWUNMI, G. O.; YISAK, W.A.; OGUNLANA, E.O. Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* D.C. Staf. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 12, p. 279-286, 1984.

OPALCHENOVA, G.; OBRESHKOVA, D. Comparative studies on the activity of basil - an essential oil from *Ocimum basilicum* L. - against multidrug resistant clinical isolates of the genera *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Pseudomonas* by using different test methods. **Journal of Microbiological Methods**, v. 54, n. 1, p. 105-110, 2003.

PARK, A. W.; YAACOB, H. B. Pathogenic microbes of the oral environment. **Journal of Nihon University School of Dentistry**, v. 36, n. 1, p. 1-33, 1994.

PARK, Y. S.; CHANG, H. N.; KIM, B. H. Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to solvents used in extractive fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 10, n. 4, p. 261-266, 1988.

PARVEEN, M. et al. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to a monoterpene: evaluation of antifungal potential by DNA microarray analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 46-55, 2004.

PEREA et al. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 10, p. 2676-2684, 2001.

PEREA, S.; PATTERSON, T. F. Antifungal resistance in pathogenic fungi. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, n. 9, p. 1073-1080, 2002.

PEREIRA, R. S. et al. 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. et al. Bloodstream infections due to *Candida* species: SENTRY antimicrobial surveillance program in North America and Latin America, 1997-1998. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 3, p. 747-751, 2000.

PFALLER, M. A. et al. Cross-resistance between fluconazole and ravuconazole and the use of fluconazole as a surrogate marker to predict susceptibility and resistance to ravuconazole among 12,796 clinical Isolates of *Candida* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 7, p. 3137-3141, 2004.

PFALLER, M. A. et al. In vitro susceptibilities of *Candida dubliniensis* isolates tested against the new triazole and echinocandin antifungal agents. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 870-872, 1999a.

PFALLER, M. A. et al. Trends in species distribution and susceptibility to fluconazole among blood stream isolates of *Candida* species in the United States. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 33, n. 4, p. 217-222; 1999b.

PFALLER, M. A. et al. Variations in fluconazole susceptibility and electrophoretic karyotype among oral isolates of *Candida albicans* from patients with AIDS and oral candidiasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 59-64, 1994.

PFALLER, M. A.; REX, J. H.; RINALDI, M. G. Antifungal susceptibility testing: technical advances and potential clinical applications. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, n. 5, p. 776-784, 1997

PHAN, Q. T.; BELANGER, P. H.; FILLER, S. G. Role of hyphal formation in interactions of *Candida albicans* with endothelial cells. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 3485-3490, 2000.

PINA-VAZ, C. et al. Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds. **Journal of the European Academy of Dermatology & Venereology**, v.18, n.1, p. 73-78, 2004.

PINTO, E. et al. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and *dermatophyte* species. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 10, p. 1367-1373, 2006.

PRASAD, R. et al. Molecular cloning and characterization of a novel gene of *Candida albicans*, CDR1, conferring multiple resistance to drugs and antifungals. **Current Genetics**, v. 27, n. 4, p. 320-329, 1995.

QUALE, J. M. et al. In vitro activity of *Cinnamomum zeylanicum* against azole resistant and sensitive *Candida* species and a pilot study of cinnamon for oral candidiasis. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 24, n. 2, p.103-109, 1996.

RADUĐIENĚ, J. et al. Chemical composition of essential oil and antimicrobial activity of *Origanum vulgare*. **Biologija**, n. 4, p. 53–58, 2005

REDDING, S. W. et al. Resistance of *Candida albicans* to fluconazole during treatment of oropharyngeal candidiasis in a patient with AIDS: documentation by in vitro susceptibility testing and DNA subtype analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 18, n. 2, p. 240-242, 1994.

REEF, S. E.; MAYER, K. H. Opportunistic candidal infections in patients infected with human immunodeficiency virus: prevention issues and priorities. **Clinical Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 99-02,

REICHART, P.A. et al. High oral prevalence of *Candida krusei* in leprosy patients in northern Thailand. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 12, p. 4479-4485, 2002.

REVANKAR, S. G. et al. Clinical evaluation and microbiology of oropharyngeal infection due to fluconazole-resistant *Candida* in human immunodeficiency virus-infected patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 26, n. 4, p. 960-963, 1998.

REVANKAR, S. G. et al. Detection and significance of fluconazole resistance in oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus-infected patients. **Journal of Infectious Diseases**, v. 174, n. 4, p. 821-827, 1996.

REX, J. H et al. Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of in vitro-in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole and *Candida* infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, n. 2, p. 235-247, 1997.

REX, J. H.; RINALDI, M. G.; PFALLER, M. A. Resistance of *Candida* species to fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 1, p. 1-8, 1995.

RODERO, L. et al. *Candida dubliniensis*: primer aislamiento en Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 30, n. 1, p. 39-41, 1998.

RUHNKE, M. et al. Comparative evaluation of three antifungal susceptibility test methods for *Candida albicans* isolates and correlation with response to fluconazole therapy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 12, p. 3208-3211, 1996.

SALGUEIRO, L. R. et al. Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Lippia graveolens* from Guatemala. **Planta Medica**, v. 69, n. 1, p. 80-83, 2003a.

SALGUEIRO, L. R. et al. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Origanum virens* on *Candida* species. **Planta Medica**, v. 69, n. 9, p. 871-874, 2003b.

SALZER, U. J. The analysis of essential oils and extracts (oleoresins) from seasonings – a critical review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 9, p. 345-373, 1977

SAMARANAYAKE, L. P. Oral mycoses in HIV infection. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 73, n. 2, p. 171-180, 1992.

SAMARANAYAKE, L. P.; HOLMSTRUP, P. Oral candidiasis and human immunodeficiency virus infection. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 18, n. 10, p. 554-564, 1989.

SANGEORZAN, J. A. et al. Epidemiology of oral candidiasis and HIV-infected patients: colonization, infection, treatment, and emergence of fluconazole resistance. **The American Journal Medicine**, v. 97, n. 4, p. 339-346, 1994.

SANGLARD, D. et al. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.39, n. 11, p. 2378-2386, 1995.

SANGLARD, D.; ODDS, F. C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. **Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 73-85, 2002.

SANGUINETI, A.; CARMICHAEL, J.K.; CAMPBELL, K. Fluconazole-resistant *Candida albicans* after long-term suppressive therapy. **Archives of Internal Medicine**, v. 153, n. 9, p. 1122-1124, 1993.

SANGUINETTI, M. et al. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 668-679, 2005.

SANTOYO, S. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 4, p. 790-795, 2005.

SANTURIO, J. M.; SANTURIO, D. F.; POZZATTI, P., et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, v. 37, n.3, 2007. No prelo.

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275-280, 2004.

SAVILLE, S. P. et al. Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. **Eukaryotic Cell**, v. 2, p.1053–1060, 2003.

SCHAUDE, M.; ACKERBAUER, H.; MIETH, H. Inhibitory effect of antifungal agents on germ tube formation in *Candida albicans*. **Mykosen**, v. 30, n. 6, p. 281-287, 1987.

SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. **Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 287p.

SIEGEL, J. Estatística não-paramétrica. 1 ed. São Paulo: McGraw do Brasil; 1981. 313p.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J.; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 11, p. 8022-8028, 1994.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J.; POOLMAN, B. Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 2, p. 201-222, 1995.

SILVERMAN et al. Clinical characteristics and management responses in 85 HIV-infected patients with oral candidiasis. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics**, v. 82, n. 4, p. 402-407, 1996.

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

SIMONETTI, N.; STRIPPOLI, V.; CASSONE, A. Yeast mycelial conversion induced by a N-acetyl-D-glucosamine in *Candida albicans*. **Nature**, n. 250, p. 344-346, 1974.

SINGH, H. B. et al. Cinnamon bark oil, a potent fungitoxicant against fungi causing respiratory tract mycoses. **Allergy**, v. 50, n. 12, p. 995-999, 1995

SIVROPOULOU, A. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 1202-1205, 1996.

SMITH-PALMER, A; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 118-122, 1998.

SOBEL, J. D. et al. The evolution of *Candida* species and fluconazole susceptibility among oral and vaginal isolates recovered from human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive and at-risk HIV-seronegative women. **Journal of Infectious Diseases**, v. 183, n. 2, p. 286-93, 2000.

SOBEL, J. D. Vulvovaginitis due to *Candida glabrata*. An emerging problem. **Mycoses**, v. 41, n. 2, p. 18-22, 1998.

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, M. P. et al. **Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras**. Fortaleza: Edições UFC/Laboratório de Produtos Naturais, 1991.

SULLIVAN, D. et al. Widespread geographic distribution of oral *Candida dubliniensis* strains in human immunodeficiency virus-infected individuals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 960-964, 1997.

SULLIVAN, D. J. et al. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. **Microbiology**, v. 141, n. 7, p. 1507-1521, 1995.

SULLIVAN, D. J. et al. *Candida dubliniensis*: an update. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 16, n. 2, p. 72-76, 1999.

SULLIVAN, D. J.; COLEMAN, D. *Candida dubliniensis*: an emerging opportunistic pathogen. **Current Topics in Medical Mycology**, v. 8, p. 15-25, 1997.

TALLEY, S. M.; COLEY, P. D.; KURSAR, T. A. Antifungal leaf surface metabolites correlate with fungal abundance in sagebrush populations. **Journal of Chemical Ecology**, v. 28, n. 11, p. 2141-2168, 2002.

TAMPIERI, M. P. et al. The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components. **Mycopathologia**, v. 159, n. 3, p. 339-345, 2005.

TAVEIRA, S. M. et al. Seasonal variation in the essential oil of *Pilocarpus microphyllus* Stapf. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 75, n. 1, p. 27-31, 2003.

TAVITIAN, A. et al. Ketoconazole-resistant *Candida* esophagitis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. **Gastroenterology**, v. 90, n. 2, p. 443-445, 1986.

ULTEE, A.; KETS, E.O.W.; SMID, E. J. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 65, n. 10, p. 4606-4610, 1999.

URIBE, S.; RAMIREZ, J.; PENA, A. Effects of β -pinene on yeast membrane functions. **Journal of Bacteriology**, v. 161, n. 3, p. 1195-1200, 1985.

UTPALENDU, J.; CHATTOPADHYAY, R. N.; PRASAD, S. B. Preliminary studies on anti-inflammatory activity of *Zingiber officinale* Roscoe, *Vitex negundo* Linn. and *Tinospora cordifolia* (Willid) Miers in albino rats. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 31, n. 3, p. 232-233, 1999.

VAN LOOSDRECHT, M. C. M. et al. Influence of interfaces on microbial activity. **Microbiology and molecular Biology Reviews**, v. 54, n. 1, p. 75–87, 1990.

VAN METER, F. et al. A study of oral candidiasis in HIV-positive patients. **Journal of Dental Hygiene**, v. 68, n. 1, p. 30-34, 1994.

VAZQUEZ, J. A. et al. *In vitro* susceptibilities of *Candida* and *Aspergillus* species to *Melaleuca alternafolia* (tea tree) oil. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 17, n. 2, p. 60-63, 2000.

VAZQUEZ, J. A. Therapeutic options for the management of oropharyngeal and esophageal candidiasis in HIV/AIDS patients. **HIV Clinical Trials**, v. 1, n. 1, p. 47-59, 2000.

VAZQUEZ, R. S.; DUNFORD, N.T. Bioactive components of mexican oregano oil as affected by moisture and plant maturity. **Journal of Essential Oil Research**, v.17, n. 6, p. 668-671, 2005.

VELICKOVIC, A. et al. The possibilities of the application of some species of sage (*Salvia* L.) as auxiliaries in the treatment of some diseases. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 68, n. 6, p. 435-445, 2003.

VERMITSKY, J. P.; EDLIND, T. D. Azole resistance in *Candida glabrata*: coordinate upregulation of multidrug transporters and evidence for a Pdr1-like transcription factor. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 48, n. 10, p. 3773-3781, 2004.

VERNIN, G. et al. Analysis of the essential oil of *Lippia graveolens* HBK from El Salvador. **Flavour and fragrance journal**, v.16, n. 3, p. 219-226, 2001.

VISHWAKARMA, S. L. et al. Anxiolytic and antiemetic activity of *Zingiber officinale*. **Phytotherapy Research**, v. 16, n. 7, p. 621-626, 2002.

WALSH, T. J. et al. Correlation between in vitro and in vivo antifungal activities in experimental fluconazole-resistant oropharyngeal and esophageal candidíases. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 6, p. 2369-2373, 2000.

WEIS, N.; WEIGAND, H.; KNOBLOCH, K. On the Influence of terpene and phenylpropane derivatives on bacterial respiration and oxidative phosphorylation. **Biological Chemistry: Hope-Seyler**, v. 366, p. 866, 1985.

WHITE, A.; GOETZ, M. B. Azole-resistant *Candida albicans*: report of two cases of resistance to fluconazole and review. **Clinical Infectious Diseases**, v. 19, n. 4, p. 687-692, 1994

WHITE, T. C. Antifungal drug resistance in *Candida albicans*. **ASM News**, v. 63, p. 427-433, 1997.

WHITE, T. C. Mechanisms of resistance to antifungal agents. In:__. **Manual of Clinical Microbiology**. 8 ed. Washington DC: American Society for Microbiology, 2003. v. 2, cap. 123, p. 1869-79.

WHITE, T. C.; MARR, K. A.; BOWDEN, R. A. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, n.2, p. 382-402, 1998.

WIRSCHING, S. et al. MDR1-mediated drug resistance in *Candida dubliniensis*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 45, n. 12, p. 3416-3421, 2001.

YOSHIKAWA, M. et al. Stomachic principles in ginger. III. An anti-ulcer principle, 6-gingesulfonic acid, and three monoacyldigalactosylglycerols, gingerglycolipids A, B and C, from *Zingiberis Rhizoma* originating in Taiwan. **Chinese Pharmacological Bulletin**, v. 42, n. 6, p. 1226-1230, 1994.

9 ANEXOS

9.1 Anexo 1 – Preparação dos meios de cultura utilizados no estudo

9.1.1 Agar Sabouraud

Peptona	10g
Dextrose	20g
Ágar.....	15g
Água destilada q.s.p.	1000mL

Adicionar o ágar à água destilada e ferver até a solubilização completa. Adicionar os outros compostos a mistura e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

9.1.2 Meio RPMI 1640

10,4g de RPMI-1640 em pó (com glutamina e vermelho fenol, sem bicarbonato);
34,53g de tampão MOPS (ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico);
Dissolver o meio em pó em 900mL de água destilada. Acrescentar o MOPS (concentração final de 0,165mol/L), agitando até dissolver. Ajustar o pH para 7,0 a 25°C, usando hidróxido de sódio 1mol/L. Acrescentar água adicional para ajustar o volume final de 1 L. Esterilizar por filtração e armazenar a 4°C.

9.1.3 Caldo fase M

YNB (Yeast nitrogen base).....	3,35g
NAG (n-acetil-glucosamina)	0,221g
L-prolina	0,115g
Tampão Fosfato	1000mL

Tampão fosfato

NaH ₂ PO ₄	1,62g
K ₂ HPO ₄	4,6g
Água dest. q.s.p	1000mL

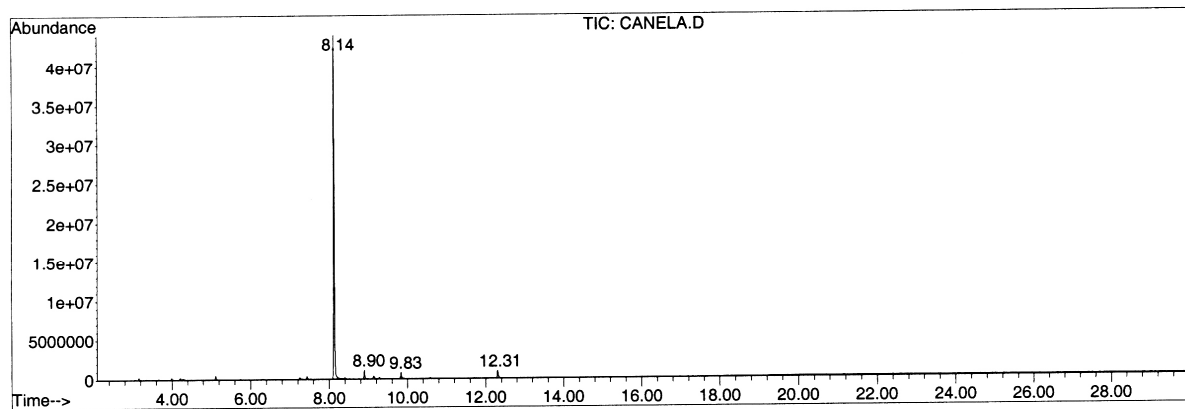
Os componentes sólidos são dissolvidos no tampão fosfato e a solução resultante, após esterilização por filtração, é conservada a 4°C.

9.2 Anexo 2 – Cromatogramas dos óleos essenciais e espectros de massas dos seus componentes majoritários.

9.2.1 Cromatograma do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* (canela)

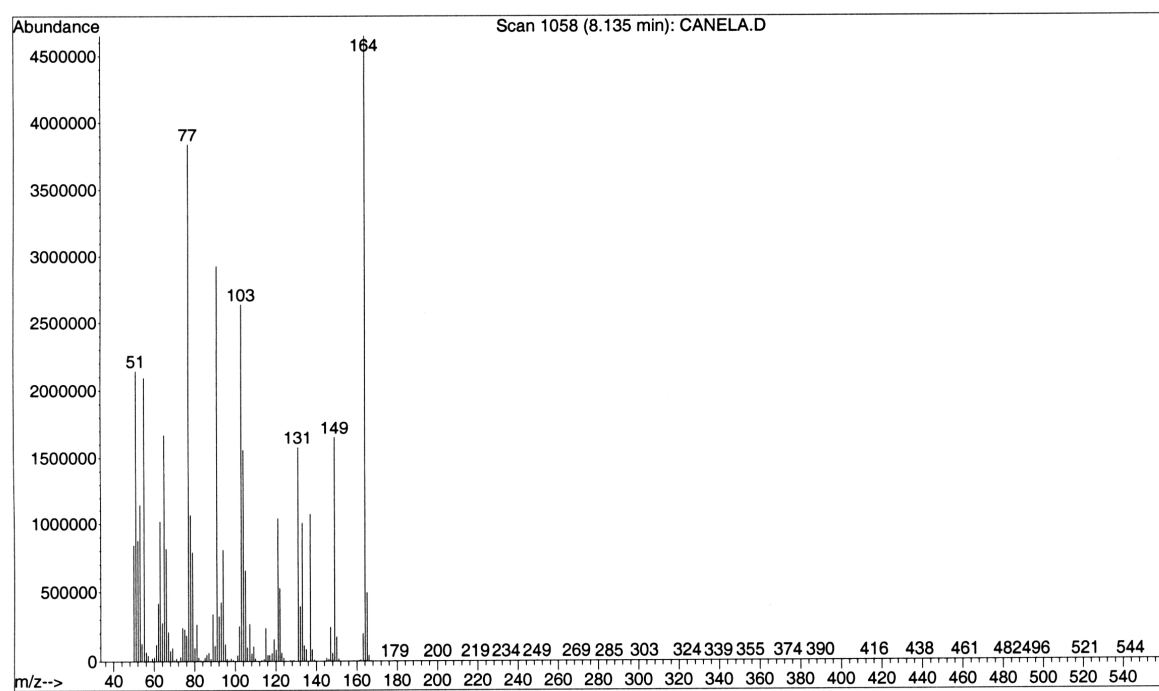
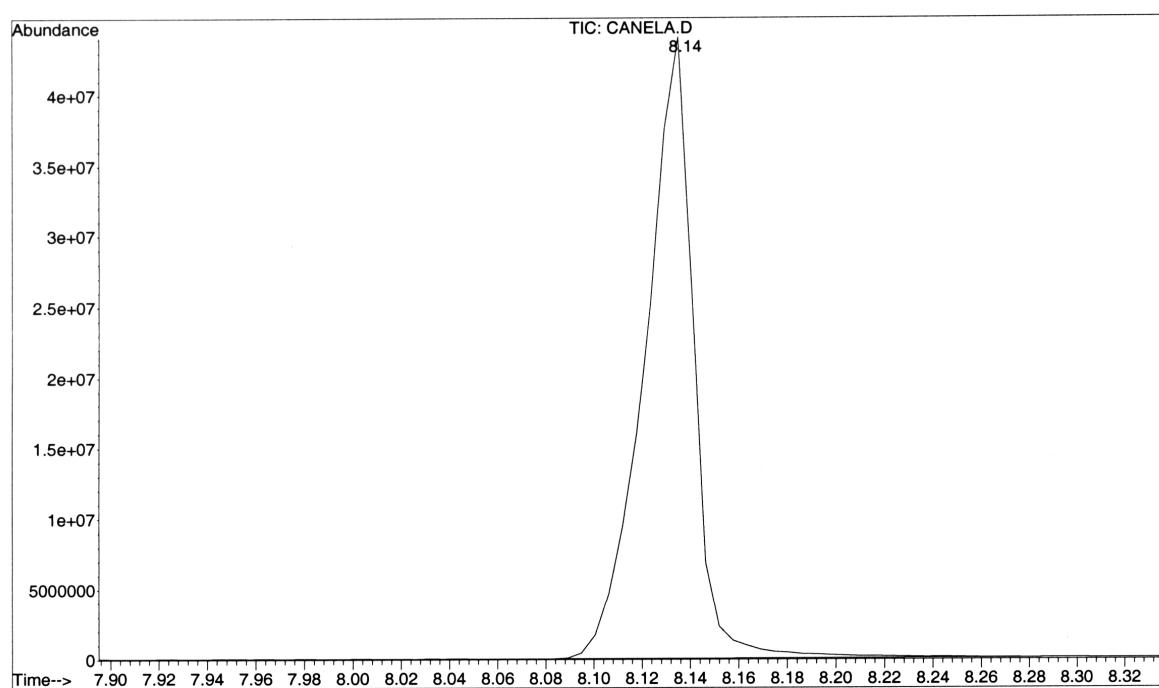
Area Percent Report -- Sorted by Signal

Information from Data File:
File : D:\HPCHEM\1\DATA\GERAL\CANELA.D
Operator : T.G.SCHWANZ
Acquired : 30 Aug 2006 1:13 am using AcqMethod GERAL
Sample Name: CANELA
Misc Info :
Vial Number: 13
CurrentMeth: D:\HPCHEM\1\METHODS\GERAL.M



Retention Time	Area	Area %	Ratio %
Total Ion Chromatogram			
8.136	615792000	93.295	100.000
8.896	16314830	2.472	2.649
9.834	11856508	1.796	1.925
12.307	16083303	2.437	2.612

9.2.1.1 Espectro de massas do Z-isoeugenol

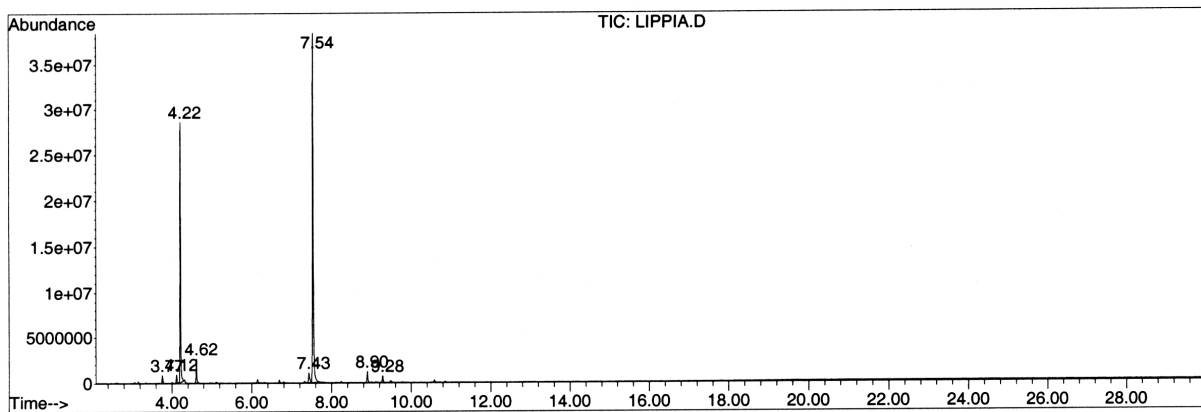


9.2.2 Cromatograma do óleo essencial de *Lippia graveolens* (orégano mexicano)

Area Percent Report -- Sorted by Signal

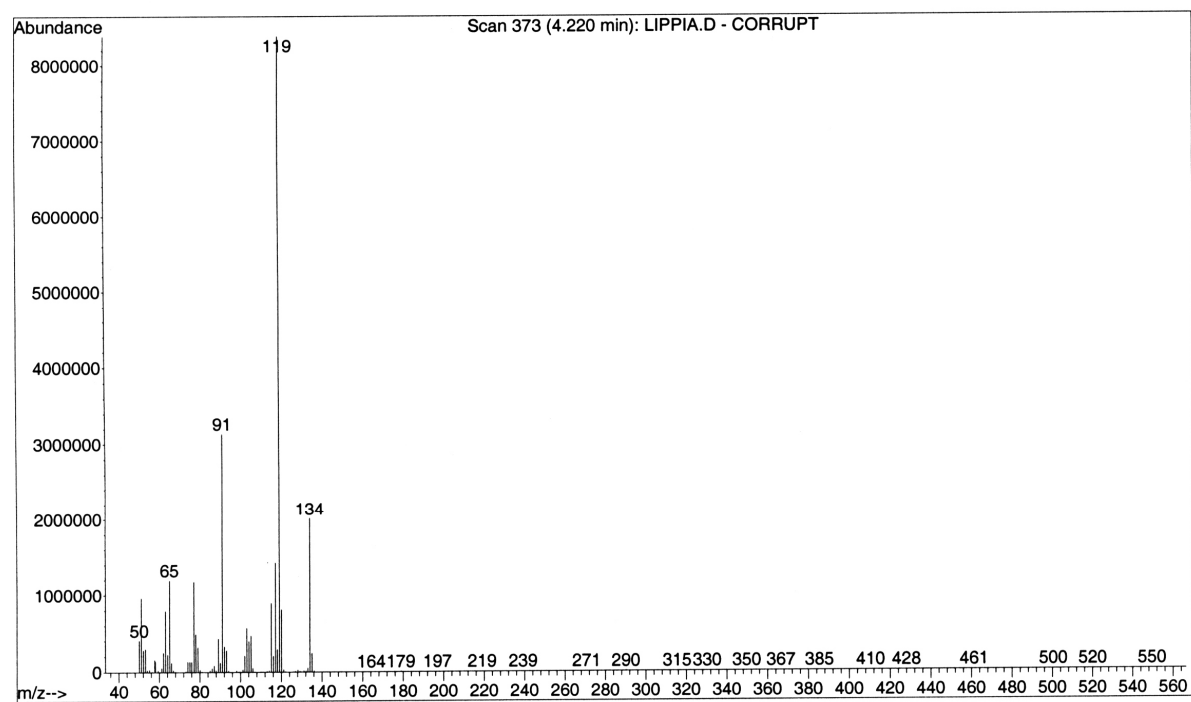
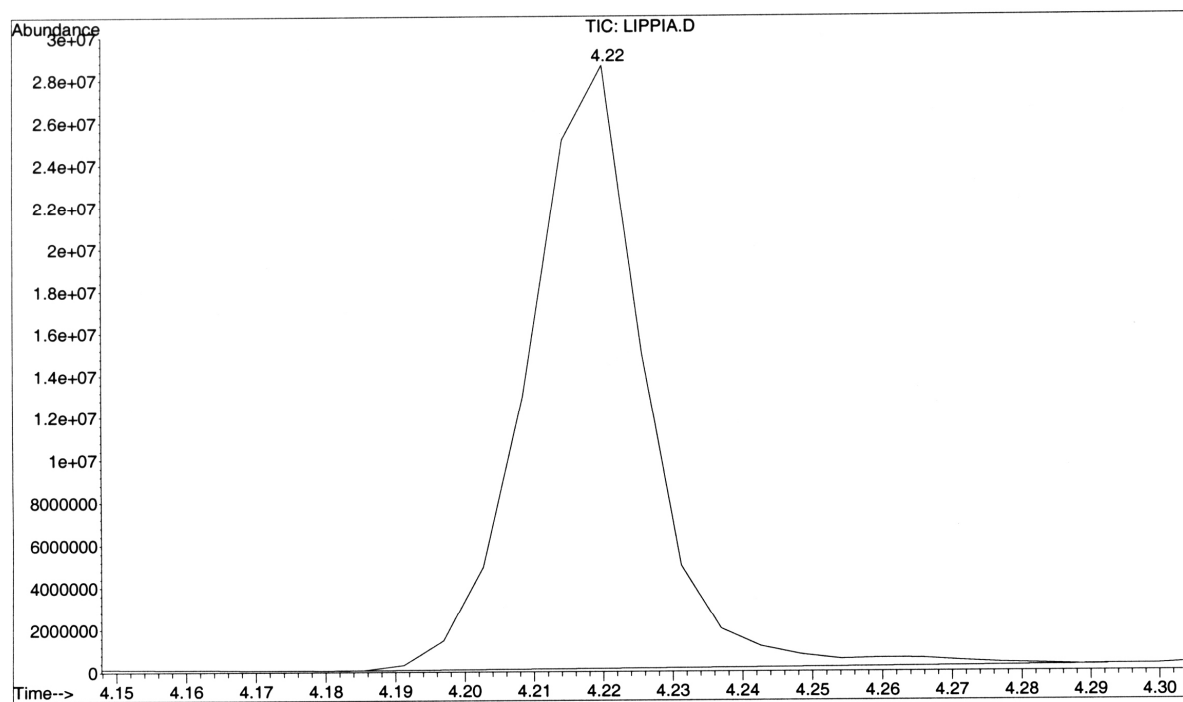
Information from Data File:

File : D:\HPCHEM\1\DATA\GERAL\LIPPIA.D
 Operator : T.G.SCHWANZ
 Acquired : 29 Aug 2006 8:32 pm using AcqMethod GERAL
 Sample Name: LIPPIA
 Misc Info :
 Vial Number: 6
 CurrentMeth: D:\HPCHEM\1\METHODS\GERAL.M

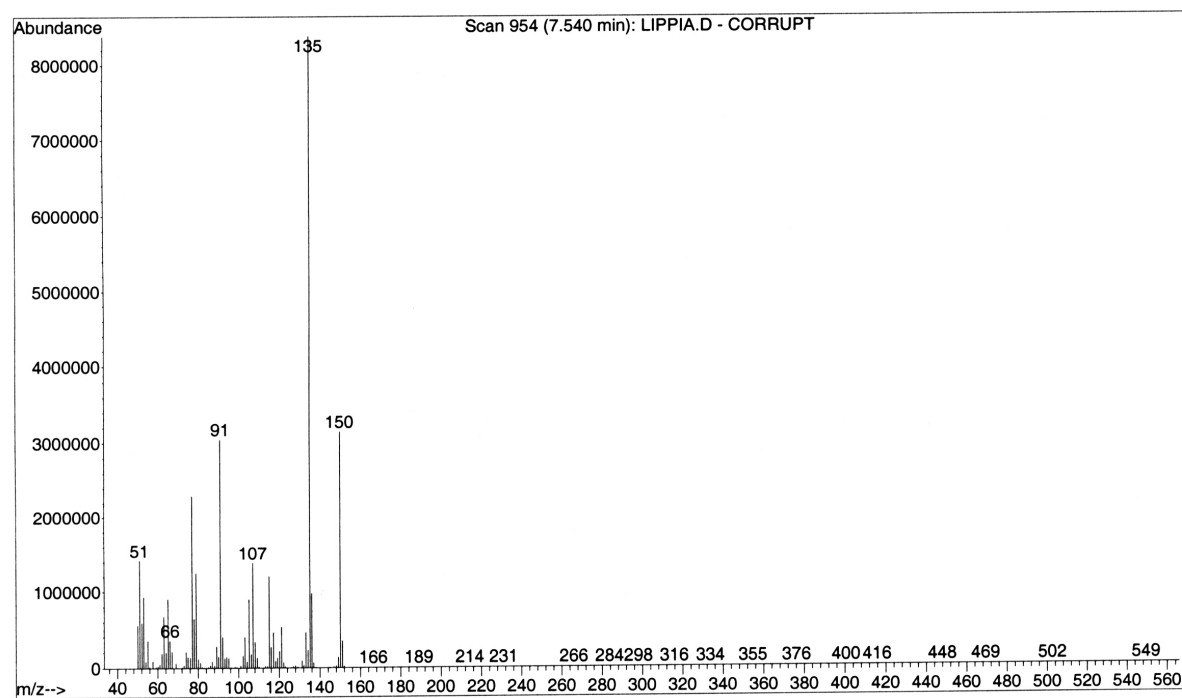
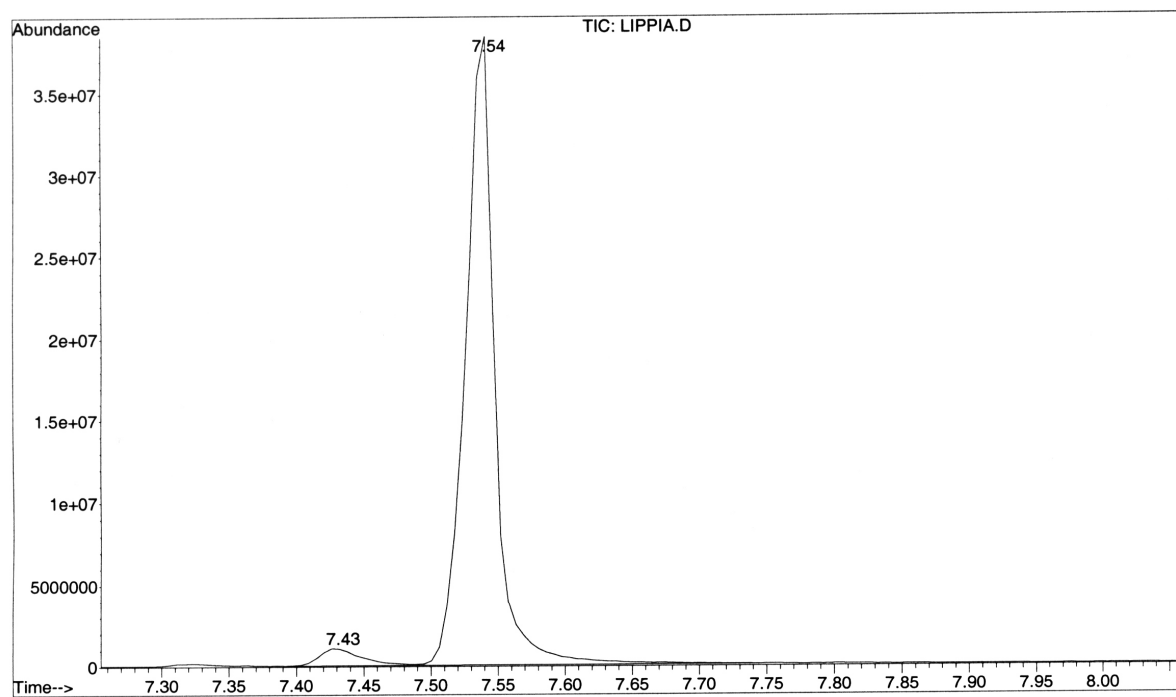


Retention Time	Area	Area %	Ratio %
Total Ion Chromatogram			
3.766	11432164	1.102	1.942
4.120	12717163	1.226	2.160
4.220	333930111	32.200	56.711
4.620	37411723	3.607	6.354
7.431	22484384	2.168	3.819
7.540	588823976	56.778	100.000
8.897	18737670	1.807	3.182
9.281	11518857	1.111	1.956

9.2.2.1 Espectro de massas do o-cimeno



9.2.2.1 Espectro de massas do carvacrol

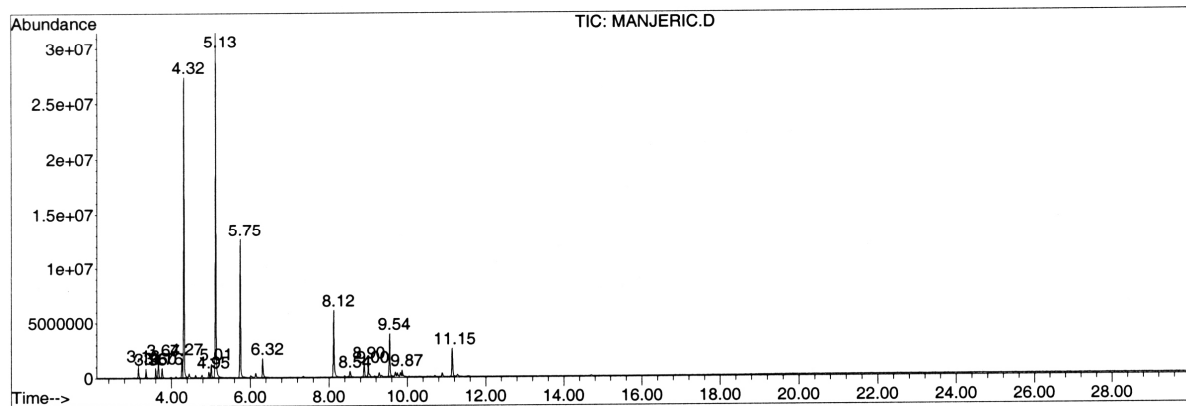


9.2.3 Cromatograma do óleo essencial de *Ocimum basilicum* (manjeriço)

Area Percent Report -- Sorted by Signal

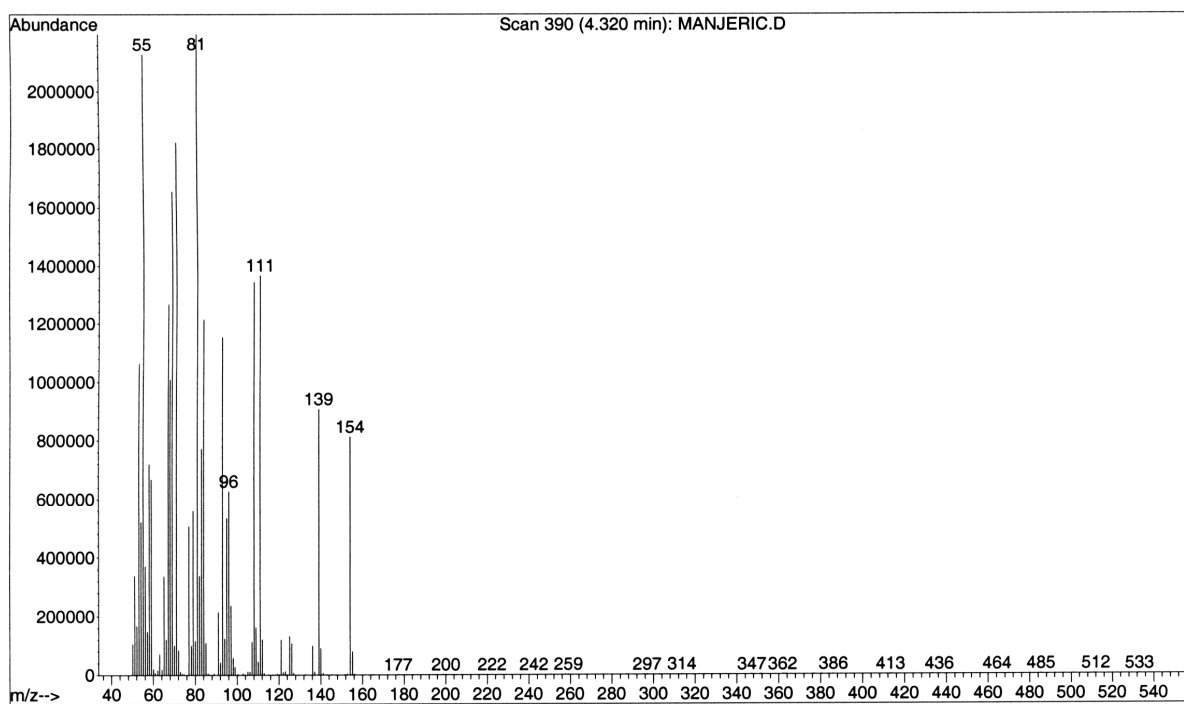
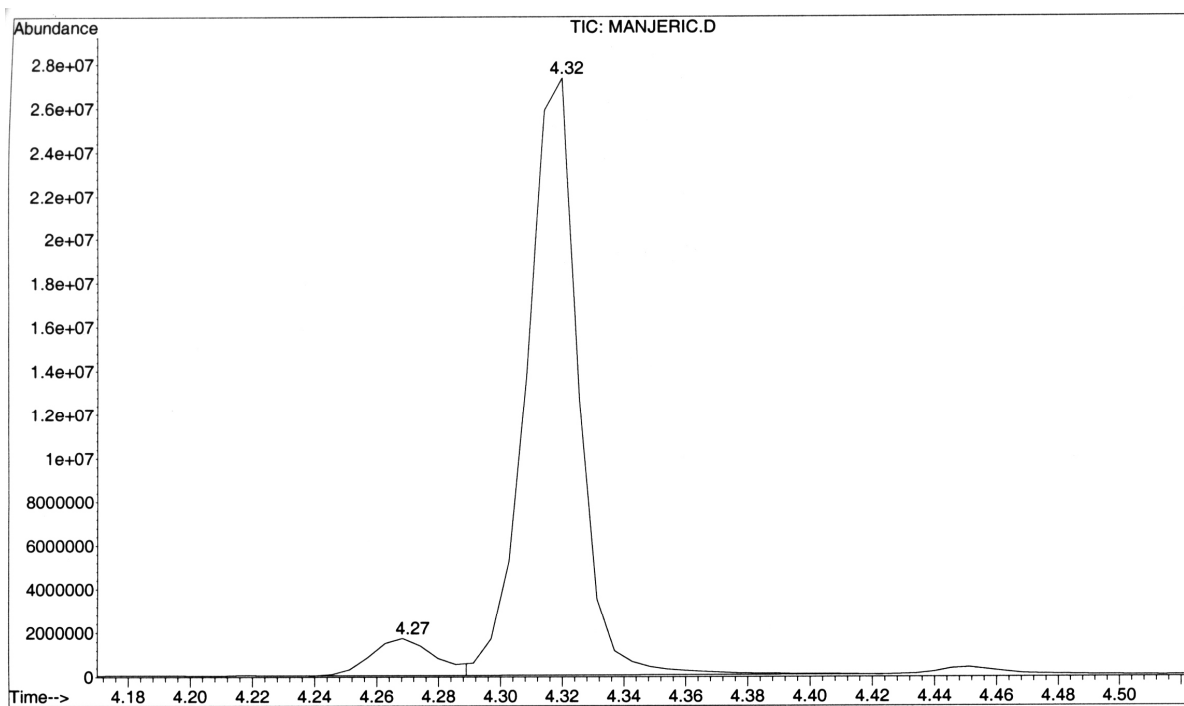
Information from Data File:

File : D:\HPCHEM\1\DATA\GERAL\MANJERIC.D
 Operator : T.G.SCHWANZ
 Acquired : 29 Aug 2006 11:28 pm using AcqMethod GERAL
 Sample Name: MANJERIC
 Misc Info :
 Vial Number: 10
 CurrentMeth: D:\HPCHEM\1\METHODS\GERAL.M

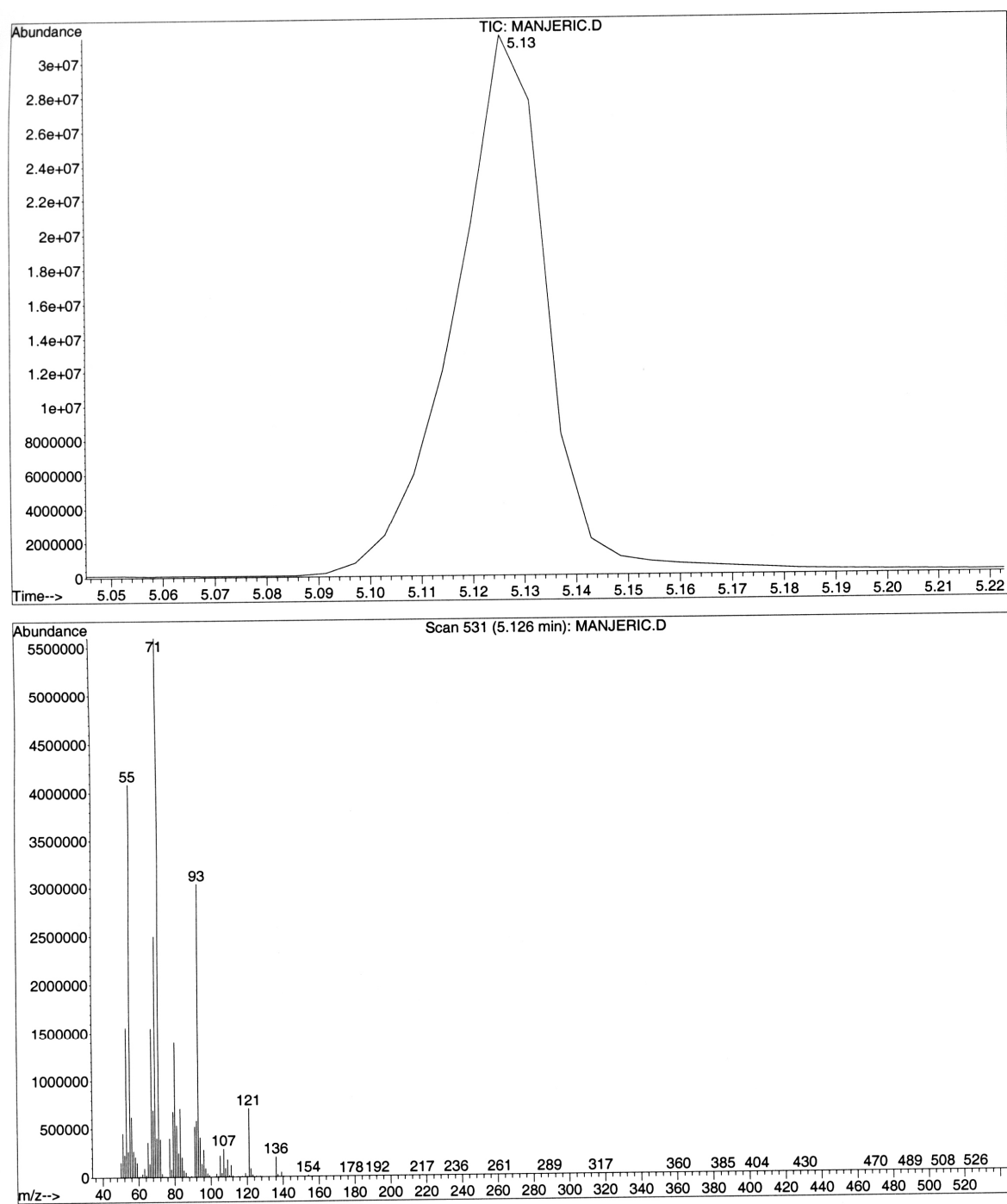


Retention Time	Area	Area %	Ratio %
Total Ion Chromatogram			
3.160	14330994	1.131	3.623
3.354	11569113	0.913	2.925
3.599	11548071	0.911	2.920
3.669	22634798	1.787	5.722
3.765	12515900	0.988	3.164
4.270	22957015	1.812	5.804
4.320	299111275	23.609	75.619
4.954	7389836	0.583	1.868
5.014	17176741	1.356	4.343
5.129	395549264	31.221	100.000
5.750	162203582	12.803	41.007
6.317	26711411	2.108	6.753
8.122	102360642	8.079	25.878
8.539	10691405	0.844	2.703
8.896	21202082	1.673	5.360
9.003	17151494	1.354	4.336
9.545	61263974	4.836	15.488
9.866	6050459	0.478	1.530
11.146	44528943	3.515	11.257

9.2.3.1 Espectro de massas do 1,8-cineol



9.2.3.2 Espectro de massas do linalol

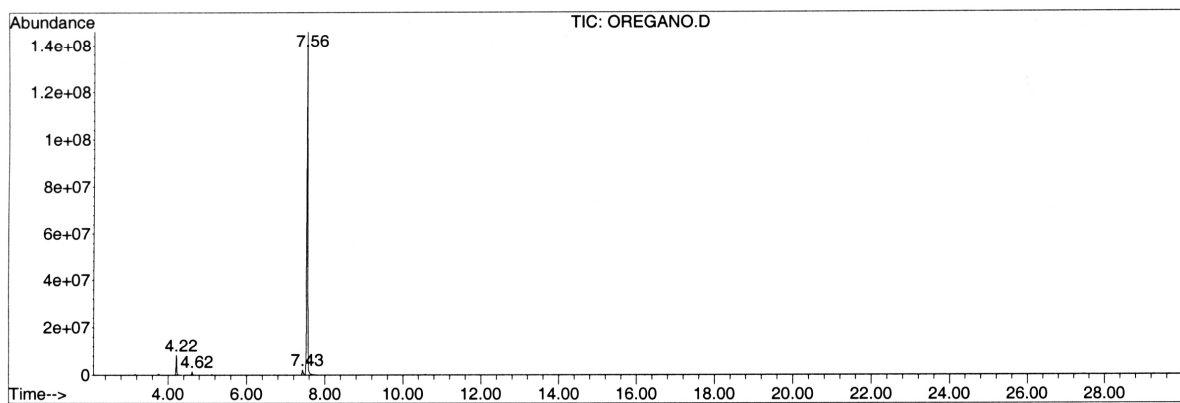


9.2.4 Cromatograma do óleo essencial de *Origanum vulgare* (orégano)

Area Percent Report -- Sorted by Signal

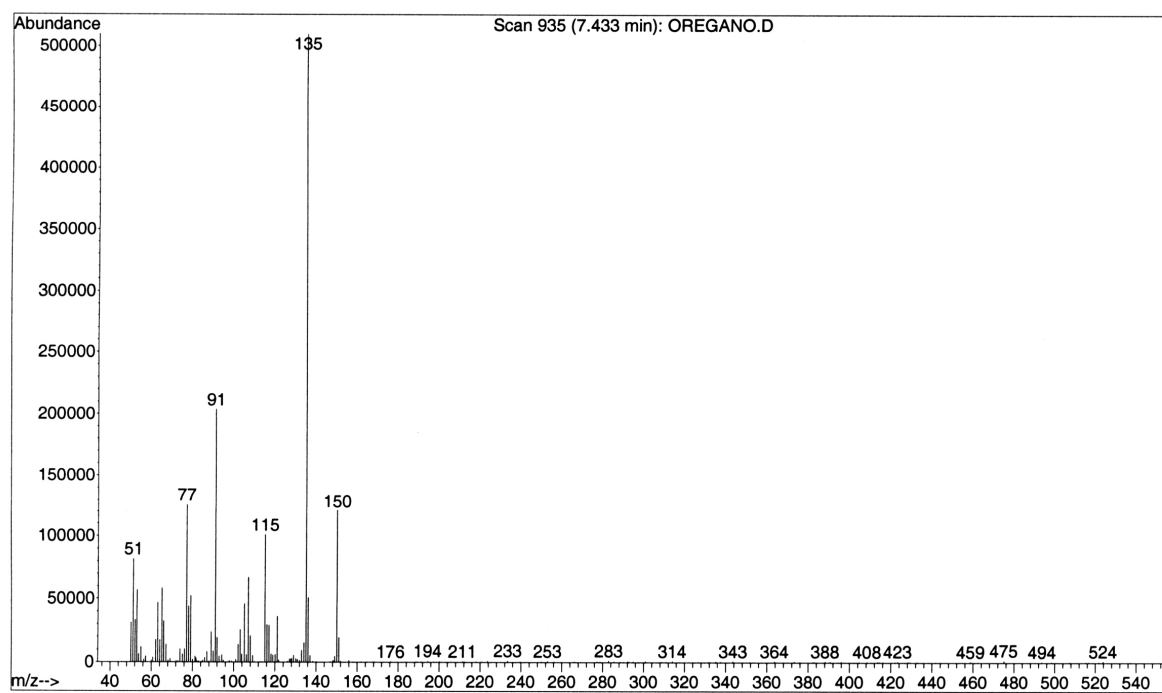
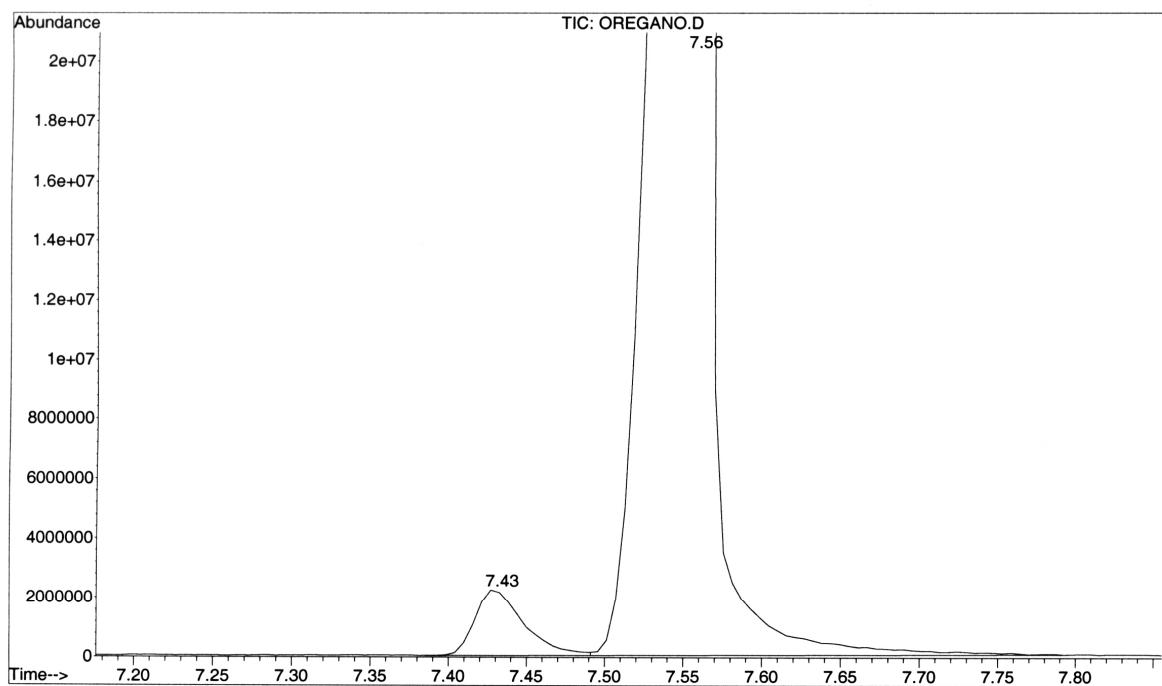
Information from Data File:

File : D:\HPCHEM\1\DATA\GERAL\OREGANO.D
Operator : T.G.SCHWANZ
Acquired : 29 Aug 2006 9:07 pm using AcqMethod GERAL
Sample Name: OREGANO
Misc Info :
Vial Number: 7
CurrentMeth: D:\HPCHEM\1\METHODS\GERAL.M



Retention Time	Area	Area %	Ratio %
Total Ion Chromatogram			
4.216	112022434	4.562	4.926
4.620	21990508	0.896	0.967
7.431	47444103	1.932	2.086
7.560	2274204659	92.611	100.000

9.2.4.1 Espectro de massas do carvacrol

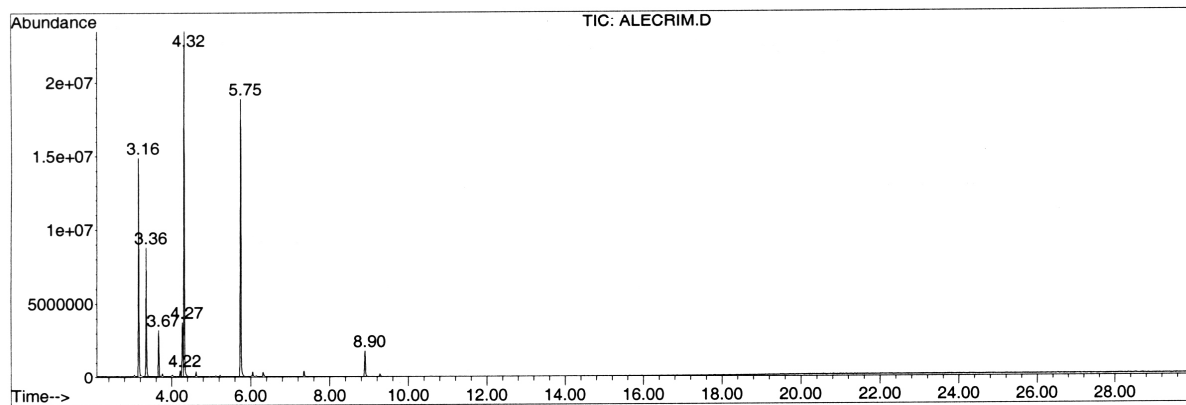


9.2.5 Cromatograma do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* (alecrim)

Area Percent Report -- Sorted by Signal

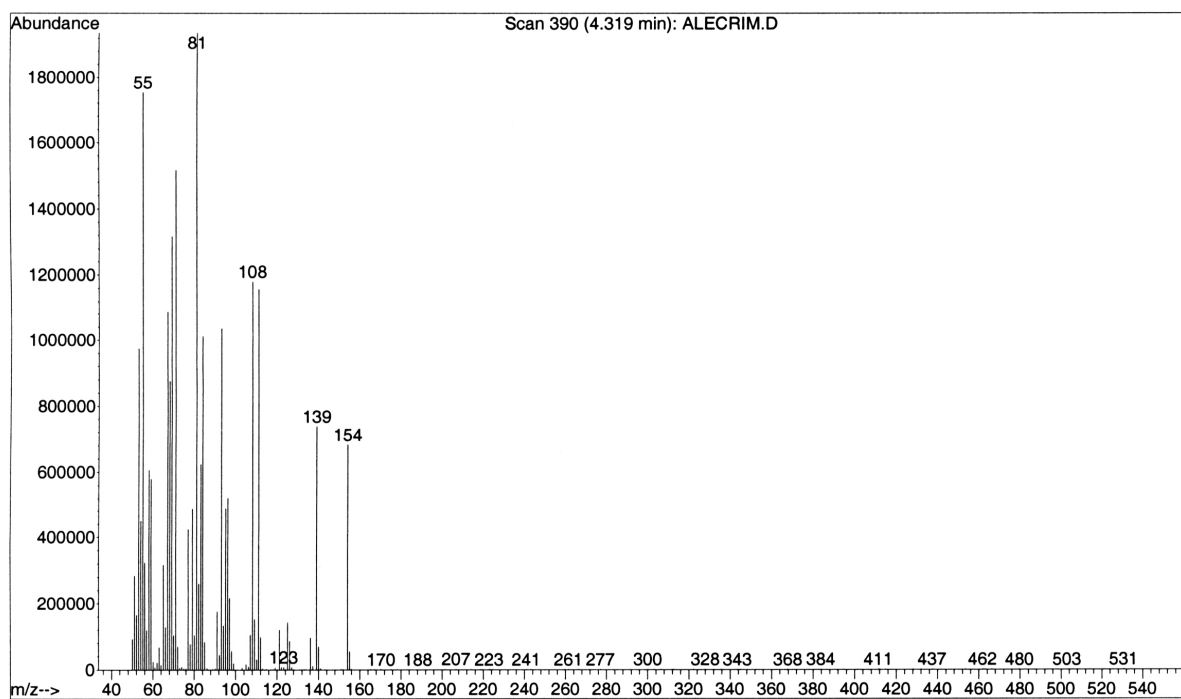
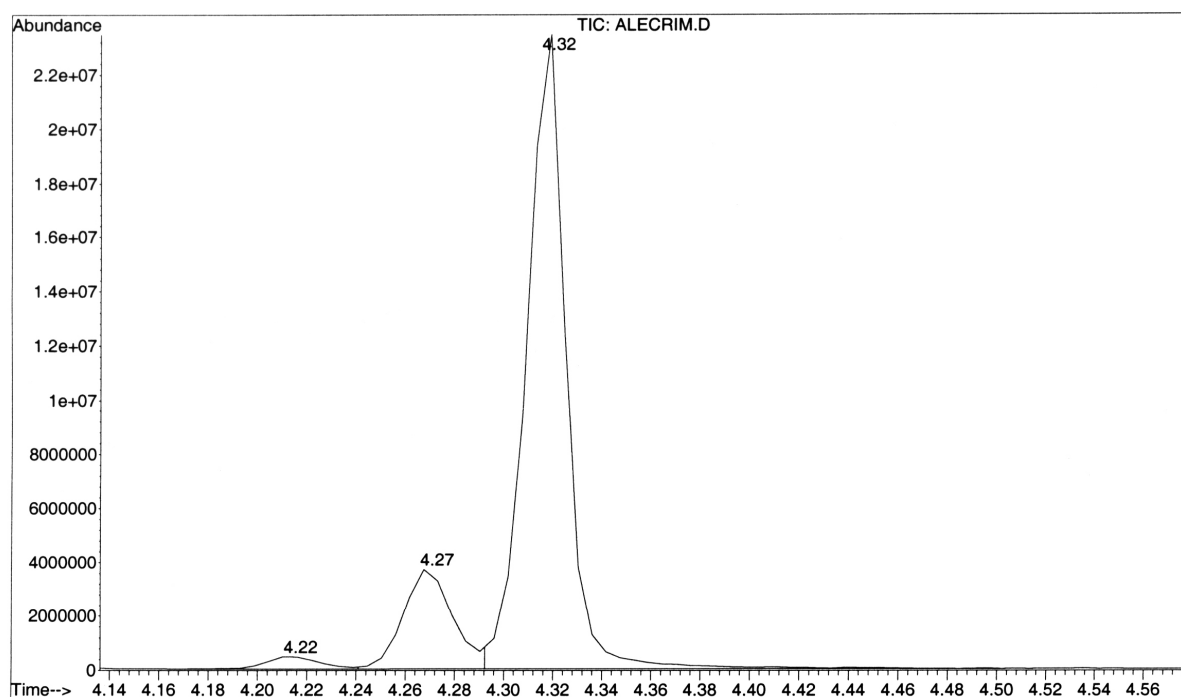
Information from Data File:

File : D:\HPCHEM\1\DATA\GERAL\ALECRIM.D
 Operator : T.G.SCHWANZ
 Acquired : 29 Aug 2006 9:42 pm using AcqMethod GERAL
 Sample Name: ALECRIM
 Misc Info :
 Vial Number: 8
 CurrentMeth: D:\HPCHEM\1\METHODS\GERAL.M

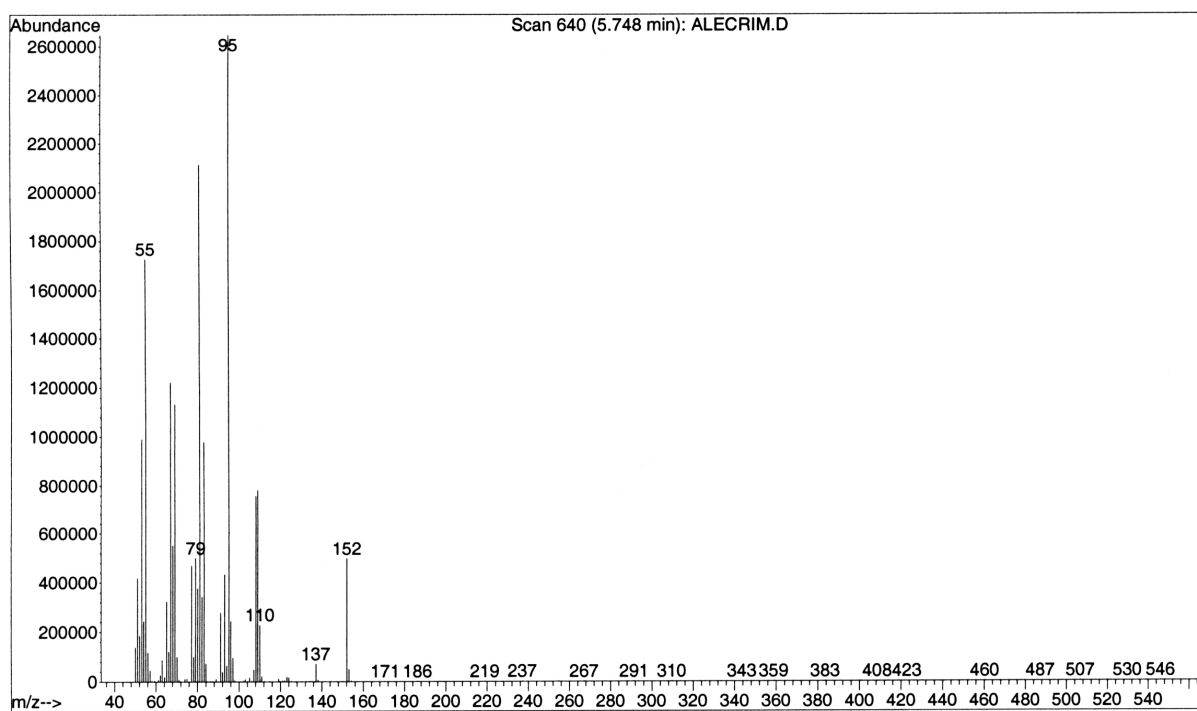
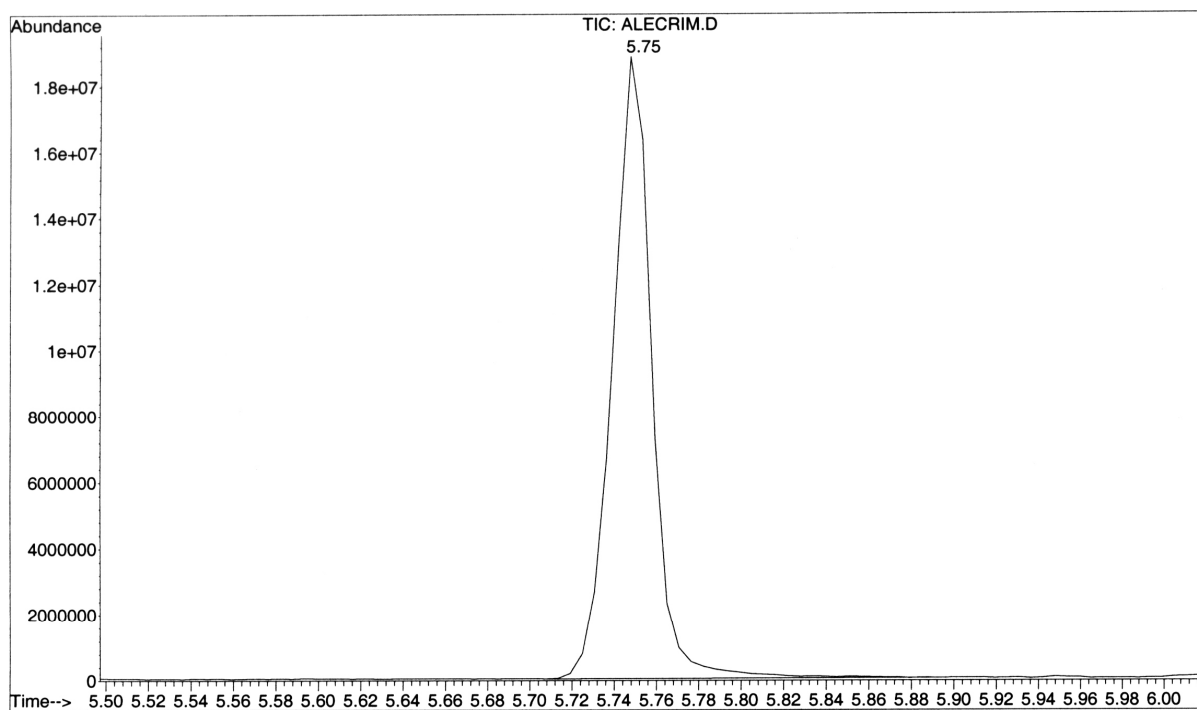


Retention Time	Area	Area %	Ratio %
Total Ion Chromatogram			
3.163	183651393	19.814	69.308
3.355	109021776	11.762	41.144
3.670	40234983	4.341	15.184
4.216	6696750	0.722	2.527
4.271	50129022	5.408	18.918
4.320	264976909	28.588	100.000
5.751	243859245	26.309	92.030
8.897	28319813	3.055	10.688

9.2.5.1 Espectro de massas do 1,8-cineol



9.2.5.2 Espectro de massas da cânfora

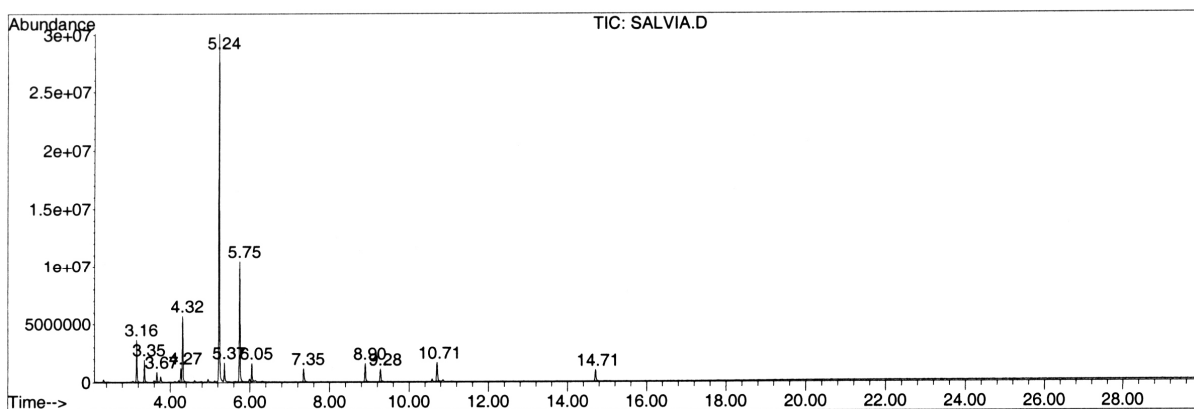


9.2.6 Cromatograma do óleo essencial de *Salvia officinalis* (sálvia)

Area Percent Report -- Sorted by Signal

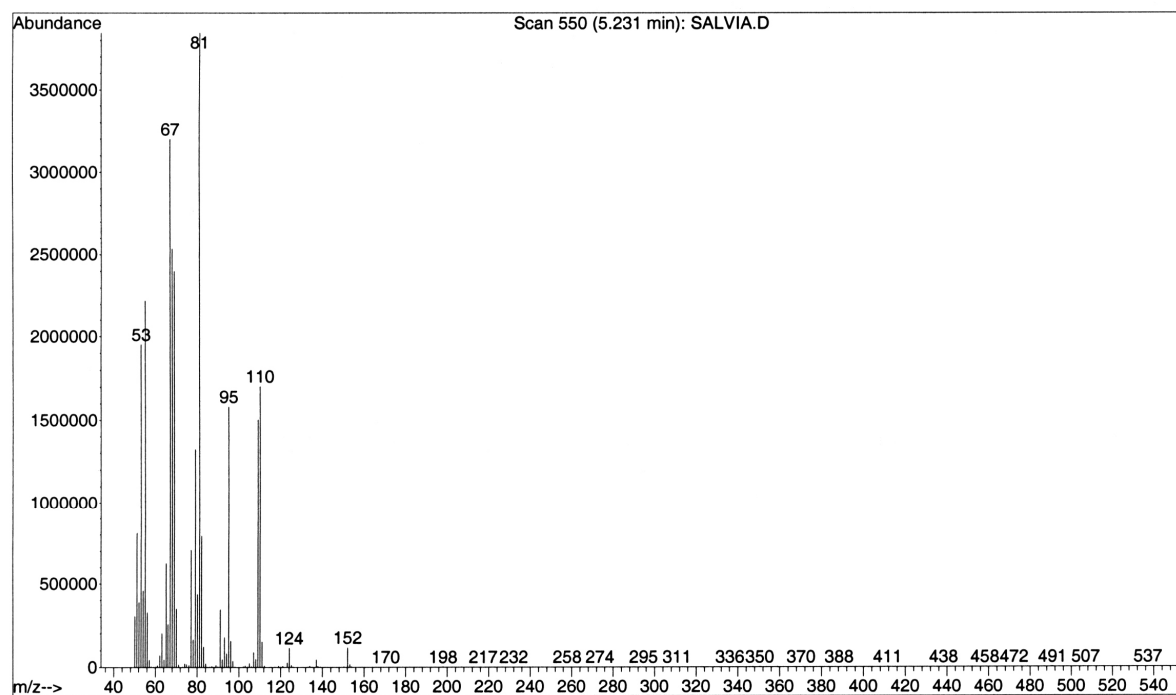
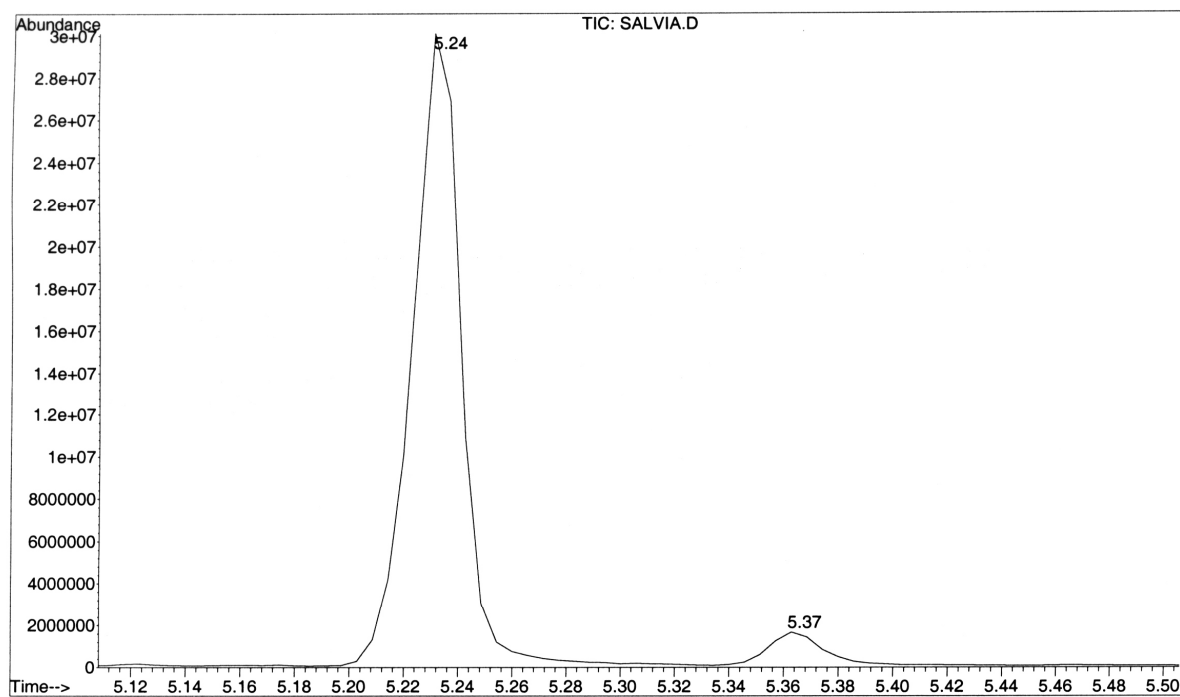
Information from Data File:

File : D:\HPCHEM\1\DATA\GERAL\SALVIA.D
 Operator : T.G.SCHWANZ
 Acquired : 30 Aug 2006 12:03 am using AcqMethod GERAL
 Sample Name: SALVIA
 Misc Info :
 Vial Number: 11
 CurrentMeth: D:\HPCHEM\1\METHODS\GERAL.M



Retention Time	Area	Area %	Ratio %
Total Ion Chromatogram			
3.161	47720386	4.819	11.868
3.354	24852076	2.510	6.181
3.669	10935026	1.104	2.720
4.268	14781242	1.493	3.676
4.316	74692391	7.543	18.576
5.235	402092384	40.607	100.000
5.366	149398499	15.088	37.155
5.749	137628113	13.899	34.228
6.051	21919194	2.214	5.451
7.351	19113106	1.930	4.753
8.896	24203533	2.444	6.019
9.280	16912354	1.708	4.206
10.708	28619604	2.890	7.118
14.710	17343793	1.752	4.313

9.2.6.1 Espectro de massas da cis-tujona

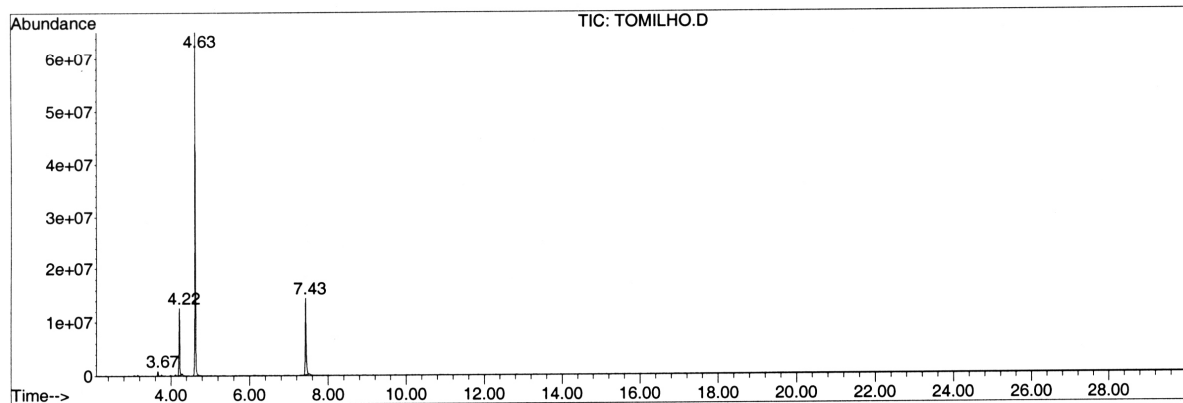


9.2.7 Cromatograma do óleo essencial de *Thymus vulgaris* (tomilho)

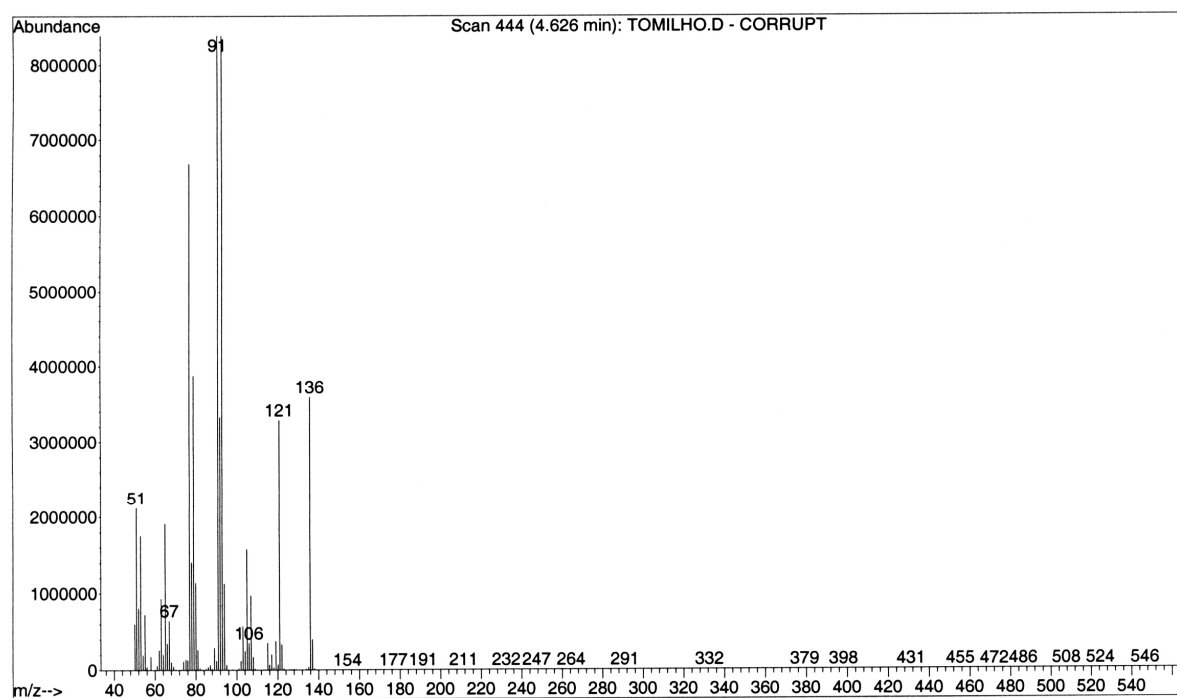
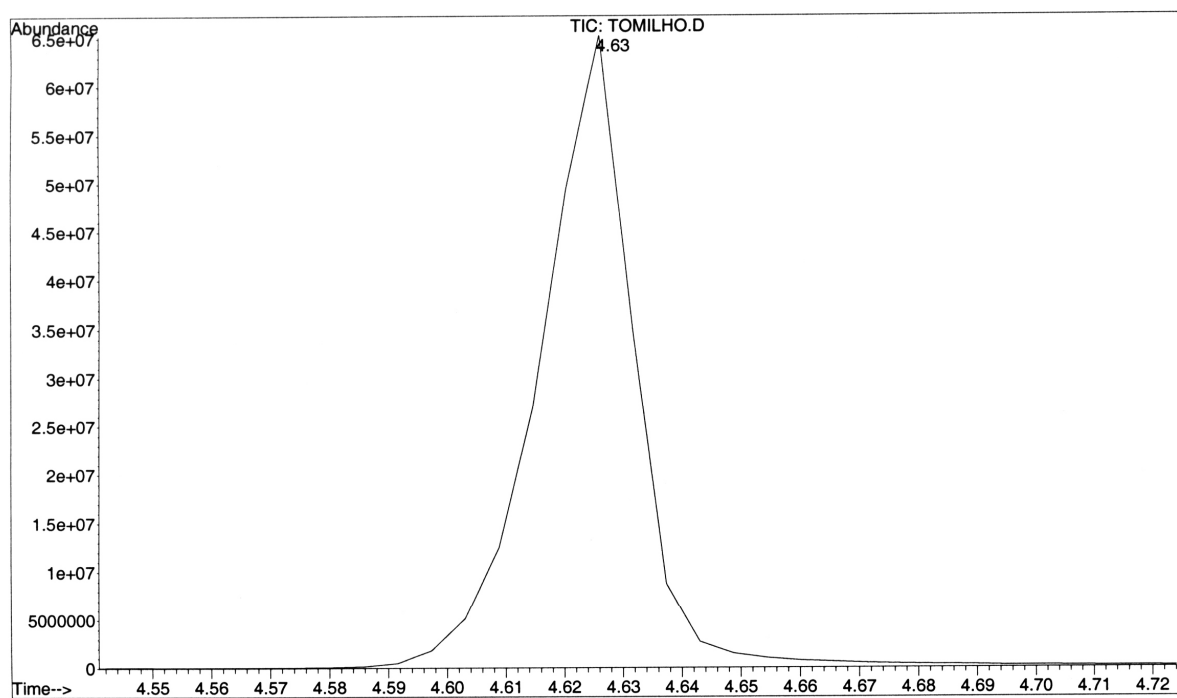
Area Percent Report -- Sorted by Signal

Information from Data File:

File : D:\HPCHEM\1\DATA\GERAL\TOMILHO.D
Operator : T.G.SCHWANZ
Acquired : 29 Aug 2006 10:17 pm using AcqMethod GERAL
Sample Name: TOMILHO
Misc Info :
Vial Number: 9
CurrentMeth: D:\HPCHEM\1\METHODS\GERAL.M



Retention Time	Area	Area %	Ratio %
Total Ion Chromatogram			
3.670	11836842	1.038	1.624
4.217	159340550	13.979	21.858
4.627	728990732	63.953	100.000
7.430	239724160	21.030	32.884

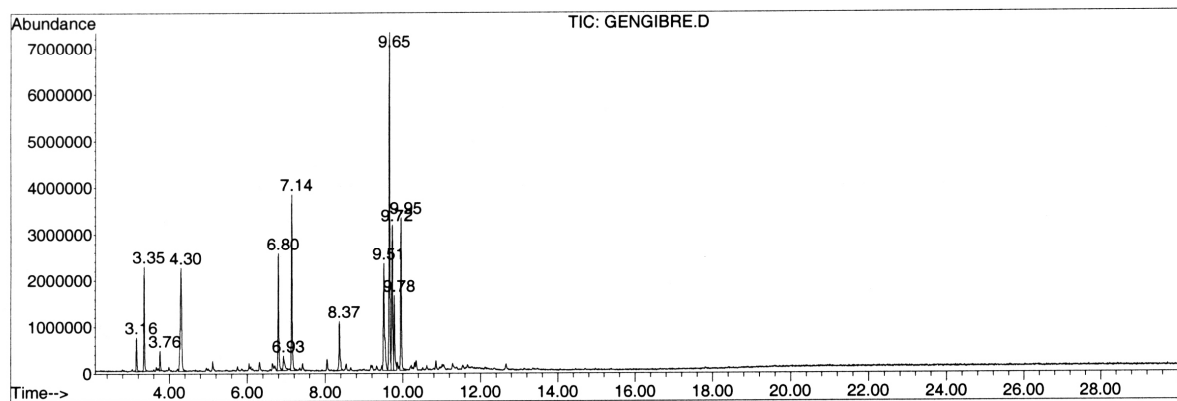
9.2.7.1 Espectro de massas do γ -terpineno

9.2.8 Cromatograma do óleo essencial de *Zingiber* sp. (gengibre)

Area Percent Report -- Sorted by Signal

Information from Data File:

File : D:\HPCHEM\1\DATA\GERAL\GENGIBRE.D
 Operator : T.G.SCHWANZ
 Acquired : 30 Aug 2006 12:38 am using AcqMethod GERAL
 Sample Name: GENGIBRE
 Misc Info :
 Vial Number: 12
 CurrentMeth: D:\HPCHEM\1\METHODS\GERAL.M



Retention Time	Area	Area %	Ratio %
Total Ion Chromatogram			
3.161	10118728	1.942	9.334
3.354	29445883	5.651	27.161
3.765	5454831	1.047	5.032
4.297	53778207	10.321	49.606
6.798	39252460	7.533	36.207
6.933	9167232	1.759	8.456
7.142	55917506	10.731	51.579
8.368	19854642	3.810	18.314
9.509	48190866	9.248	44.452
9.650	108410804	20.805	100.000
9.725	59188283	11.359	54.596
9.783	27830384	5.341	25.671
9.952	54458746	10.451	50.234

9.2.8.1 Espectro de massas do zingibereno

